

Université de Montréal

Modèles murins de prééclampsie et effets préventifs de l'entraînement physique

par

Stéphanie Falcao

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en Sciences biomédicales

janvier 2010

© Stéphanie Falcao, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Modèles murins de prééclampsie et effets préventifs de l'entraînement physique

Présentée par :
Stéphanie Falcao

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Michèle Brochu, présidente-rapporteur
Julie L.Lavoie, directrice de recherche
Jolanta Gutkowska, co-directrice
Daniel Curnier, membre du jury
Julie Lafond, examinatrice externe
Gilles Bleau, représentant du doyen de la FES

Résumé

La prééclampsie est la première cause de mortalité et de morbidité périnatale et aucun traitement, mis à part l'accouchement, n'est connu à ce jour. Pour mieux comprendre cette maladie, nous avons utilisé trois modèles animaux. Dans un premier temps, nous avons voulu confirmer la présence de prééclampsie chez les souris déficientes en p57kip2, une protéine impliquée dans le cycle cellulaire des trophoblastes. Contrairement au groupe japonais, l'hypertension et la protéinurie au cours de la gestation ne survenaient pas, malgré une perte de structure des trophoblastes dans le labyrinthe ainsi qu'une microcalcification au niveau de leurs placentas. Nous avons alors observé que la diète japonaise induisait à elle seule une diminution de la croissance fœtale, ainsi qu'une dysfonction endothéliale chez ces souris. Nos résultats démontrent que ni les altérations placentaires, ni la génétique ne sont suffisantes pour induire les symptômes de la prééclampsie dans ce modèle, et que la diète peut avoir des effets délétères chez la souris gestante peu importe le génotype. Ensuite, nous avons démontré que les souris hypertendues surexprimant la rénine et l'angiotensinogène humaine développent de la protéinurie et une augmentation de la pression artérielle au cours de la gestation. Leurs placentas sont affectés par de la nécrose et une perte de structure des trophoblastes du labyrinthe en plus de surexprimer le gène du récepteur sFlt-1. Ces souris représentent le premier modèle animal de prééclampsie superposée à de l'hypertension chronique. Finalement, en utilisant des femelles normotendues surexprimant l'angiotensinogène humaine qui développent les symptômes de la prééclampsie lorsqu'elles sont accouplées à des mâles qui surexpriment la rénine humaine, nous

avons établi que l'entraînement physique normalisait la hausse de pression ainsi que l'apparition de protéinurie en fin de gestation. Aussi, l'entraînement améliorait la croissance fœtale et placentaire ainsi que la réponse vasculaire indépendante de l'endothélium, et ce, indépendamment du génotype des souris. La présence d'une prolifération exagérée et désorganisée des trophoblastes dans ce modèle était aussi normalisée. L'entraînement physique prévient donc l'apparition des symptômes de la prééclampsie dans ce modèle. Mis ensemble, nos résultats aideront à mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la prééclampsie et de sa prévention.

Mots-clés : Souris transgéniques; Système rénine-angiotensine; Grossesse; Placenta

Abstract

Preeclampsia is the primary cause of maternal and foetal mortality and morbidity and no treatment, apart from delivery are known to date. To better understand this pathology, we investigated three different animal models. First, we needed to confirm preeclampsia-like symptoms in p57kip2 deficient mice, a protein implicated in the trophoblast cell cycle. Conversely to the Japanese group, we observed neither hypertension nor proteinuria in this model. However their placentas showed labyrinthine trophoblast structure loss as well as microcalcification. We therefore studied the impact of Japanese diet, which induced foetal growth restriction and endothelial dysfunction independently from genotype. Our results demonstrate that placental alterations and genetics are not sufficient to induce preeclampsia-like symptoms in this model, and that diet can have deleterious effects on pregnant mice, independently from genotype. We then demonstrated that hypertensive mice overexpressing human angiotensinogen and renin developed de novo proteinuria and had a significant increase of their hypertension during gestation. Their placentas are affected by necrosis and labyrinthine trophoblast structure loss as well as an overexpression of sFlt-1 receptors. These mice represent the first animal model of superimposed preeclampsia on chronic hypertension. Finally, we used normotensive females overexpressing human angiotensinogen, which develop preeclampsia-like symptoms when they are mated with males overexpressing human rennin, to establish that exercise training normalised hypertension and proteinuria at the end of gestation. Moreover, exercise training ameliorates foetal and placental growth as

well as endothelium-independent relaxation, independently from the genotype. Exaggerated and disorganised proliferation of trophoblasts in this model is also normalised. Exercise training prevents preeclampsia-like symptoms in this model. Taken together, our results will help a better understanding of this disease and its prevention.

Keywords: Transgenic mice; Renin-angiotensin system; Pregnancy; Placenta

Table des matières

Liste des tableaux	viii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations.....	x
Remerciements	xv
Introduction	1
Chapitre 1- La grossesse.....	2
1.1 Implantation et placentation	2
1.1.1 Rôle de l'oxygène et de l'angiogénèse	6
1.2 Changements physiologiques chez la mère	7
Chapitre 2- La prééclampsie	12
2.1 Symptômes	12
2.2 Facteurs de risque de la prééclampsie	14
2.2.1 Épidémiologie	14
2.2.2 Facteurs génétiques.....	15
2.2.3 Impacts de la diète, du stress et de l'entraînement physique.....	20
2.3 Mécanismes proposés pour le développement de la prééclampsie ...	21
2.3.1 Défaut d'implantation placentaire	21
2.3.1.1 Histologie des placentas de femmes souffrant de prééclampsie.....	22
2.3.1.2 Hypoxie et vascularisation placentaire.....	24
2.3.2 Dysfonction endothéliale.....	25
2.3.3 Altération du système rénine-angiotensine.....	27
2.3.4 Stress oxydant.....	29
2.3.5 Inflammation et immunité.....	31
Chapitre 3 - L'hypertrophie cardiaque	33
3.1 L'hypertrophie cardiaque physiologique	33
3.2 L'hypertrophie cardiaque pathologique.....	37
Chapitre 4 - L'entraînement physique.....	41
4.1 Bénéfices cardiovasculaires	41

4.2	L'entraînement et la grossesse	47
4.3	L'entraînement et la prééclampsie	49
Chapitre 5 - Modèles animaux de prééclampsie		55
5.1	Les rongeurs.....	55
5.2	Les modèles animaux de la prééclampsie	58
5.2.1	Les souris de la lignée BPH/5.....	58
5.2.2	Les souris hANG x hRN	59
5.2.3	Les souris catéchol-o-méthyltransférase	62
5.2.4	Les souris p57kip2 ^(-/+)	63
5.2.5	Le modèle RUPP	64
5.2.6	Modèles utilisés.....	66
Chapitre 6 - Hypothèses		68
Chapitre 7 - Approche méthodologique.....		70
Chapitre 8 - Impact of diet and stress on the development of preeclampsia-like symptoms in p57^{kip2} mice		79
Chapitre 9 - Mice overexpressing both human angiotensinogen and human renin as a model of preeclampsia		113
Chapitre 10 - Exercise training can attenuate preeclampsia-like symptoms in an animal model.....		161
Chapitre 11 - Discussion		199
Bibliographie		211

Liste des tableaux

Chapitre 8

Table 1. Characteristics of pups and placentas in p57 mice on the JPN vs the N-A rodent diet.....	99
Table 2a. Composition of the N-A and JPN rodent diets	100
Table 3. Characteristics of female p57 mice on the JPN diet vs N-A rodent diet.....	101
Table 4. Weight of the whole heart and compartments in female p57 mice on the JPN diet vs N-A rodent diet.	102
Table 5. Characterization of placental pathology in p57 ^{-/+} mothers according to placental p57 expression.....	103

Chapitre 9

Table 1. Characterization of placental pathology	132
Table 2. Pup and placental weight.....	133
Table 3. Heart parameters calculated following echocardiography.	134
Table S1. Maternal body weight.....	153
Table S2. Heart parameters calculated following echocardiography.	154

Chapitre 10

Table 1 Effect of PE and ET on placental pathology.....	182
Table 2 Litter characteristics.	183
Table 3 Effect of ET and genotype on female characteristics.....	184

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1. Placenta hémochoriale.....	3
Figure 2. Invasion trophoblastique.....	4
Figure 3. Le système rénine-angiotensine élargi tel qu'il est défini à ce jour.	8
Figure 4. Effets induits par les différents peptides du système rénine-angiotensine via leurs récepteurs respectifs.....	9
Figure 5. Enzymes impliquées dans l'activation et l'inactivation des espèces réactives de l'oxygène.....	30
Figure 6. Divers types d'hypertrophie cardiaque.....	34
Figure 7. Effets de l'exercice sur l'endothélium et le muscle lisse vasculaire.	43

Chapitre 8

Figure 1. Histology of placentas from p57 ^{+/+} vs homozygote p57 ^{-/-} pups.	104
Figure 2. Vessel response to norepinephrine <i>in vitro</i>	105
Figure 3. Vessel response to vasodilators <i>in vitro</i>	106
Figure 4. Vessel response to vasodilators <i>in vitro</i>	107

Chapitre 9

Figure 1. Changes in MAP during pregnancy.....	135
Figure 2. Changes in proteinuria during gestation.	136
Figure 3. Heart-to-body weight ratio.	137
Figure 4. BNP and Nab1 gene expression in the left ventricle.	138
Figure S1. MAP throughout pregnancy.....	155
Figure S2. Placental histology.	157
Figure S3. PIGF-2 Western Blot.	158

Chapitre 10

Figure 1. Average total daily running distance before and throughout gestation.	185
Figure 2. Effect of exercise training (ET) on mean arterial pressure (MAP) during gestation.	186
Figure 3. Effect of ET on proteinuria.....	187

Figure 4. Mesenteric artery response to Ach and SNP.....	188
Figure 5. Placental VEGF expression.....	189
Figure 6. Representative placenta cytokeratin immunostaining.	190
Figure 7. Representative placenta Ki67 immunostaining.	191
Figure 8. Control immunostaining.	192

Liste des abréviations

(P)RR : Récepteur de la rénine et la pro-rénine

2-ME : 2-méthoxyœstradiol

ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine

ACE2 : Enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

Agt : Angiotensinogène

AMPA : Aminopeptidase A

AMPM : Aminopeptidase M

Ang-(1-7) : Angiotensine 1-7

AngII : Angiotensine II

AngIV : Angiotensine IV

ANP : Peptide natriurétique auriculaire

AoD : Diamètre aortique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

AT1 : Récepteur de type 1 de l'angiotensine

AT1-AA : Auto-anticorps du récepteur AT1

AT2 : Récepteur de type 2 de l'angiotensine

AVC : Accident vasculaire cérébrale

B2 : Récepteurs B2 de la bradykinine

BNP : Peptide natriurétique de type-B

Ca²⁺ : Calcium

CaCl₂ : Chlorure de Ca²⁺

CAMK : Kinase de la calmoduline

CAT : Catalase

CDK : Kinase dépendante des cyclines

COMT : Catéchol-o-méthyltransférase

***comt*^(-/-)** : Souris déficientes en COMT

DAG: Diacylglycérol
ECL : Chemiluminescence renforcée à base de luminol
EDHF : Facteur d'hyperpolarisation dérivé de l'endothélium
EDTA : Acide éthylènediaminetétra-acétique
EF : Fraction d'éjection
Egr : Facteurs de transcription de la réponse précoce de croissance
ELISA : Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
eNOS : Synthase du NO endothéliale
ER- β : Récepteurs aux œstrogènes de type bêta
ER- α : Récepteurs aux œstrogènes de type alpha
ET : Endothéline
ET-1 : Endothéline 1
ET-A : Récepteurs de l'endothéline de type A
ET-B : Récepteurs de l'endothéline de type B
FS : Fraction de raccourcissement
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
GPCRs : Récepteurs couplés aux protéines-G
GPX : Glutathione peroxydase
GST : Glutathione S-transférase
hANG : Souris surexprimant l'angiotensinogène humaine
HDL : Lipides à densité lourde
HELLP : Anémie hémolytique et cytolysé hépatique accompagnée de thrombopénie
HIF : Facteur induit par l'hypoxie
HIF1 α : Facteur induit par l'hypoxie-1 de type alpha
HLA-DR : Antigènes de leucocytes humains II DR
HPS : Hématoxyline phloxine safran
hRN : Souris surexprimant la rénine humaine
IGF-1: Insulin-like growth factor-1
IGgs : Immunoglobulines G
IL1, IL2, IL6, IL15, IL18 : Interleukines 1, 2, 6, 12, 15, 18

IL-1 β : Interleukine 1-bêta
INF- γ : Interféron gamma
iNOS : Synthase du monoxyde d'azote inducible
IRAP : Aminopeptidase régulée par l'insuline – Récepteur de l'angiotensine IV
IUGR : Restriction de croissance intra-utérine
Kv4.3 : Canaux potassiques de type Kv4.3
LDL : Lipides à densité légère
LPL : Lipoprotéine lipase
LVD : Diamètre du ventricule gauche
LVEDD : Diamètre du volume télé-diastolique
LVEDV : Volumes télé-diastolique
LVESD : Diamètre du volume télé- systolique
LVESV : Volume télé-systolique
MAPKs : Kinases activées par les protéines mitogènes
Mas : Mas oncogène –Récepteur de l'Ang 1-7;
MCIP : Modulatory calcineurin inhibiting protein
MgCl₂ : Chlorure de magnésium
MHC β : Types bêta de la chaîne lourde de la myosine
MHC α : Types alpha de la chaîne lourde de la myosine
M-MLV : Virus Moloney murin de leucémie
MTHFR : Méthyltétrahydrofolate réductase
mTOR : Cible mammifère pour la rapamycine
Na₃VO₄ : Ortovanadate de sodium
Nab1 : Protéine se liant au NGF-1-A
NaCl : Chlorure de sodium
NEP : Endopeptidase neutre
NFAT : Facteur de transcription nucléaire des cellules-T
NF- κ B : Facteur nucléaire kappa activé dans les cellules B
NGF-1-A : Facteur de croissance neuronale de type 1-A
NO : Monoxyde d'azote
OT : Ocytocine

OTR : Récepteurs à l'ocytocine
p57kip2^(-/+) : Souris hétérozygotes pour le gène p57kip2
PAI-I : Inhibiteur de l'activateur plasminogène de type-1
PE : Prééclampsie
PGI2 : Prostacycline
PI3-K : Phosphoinositide-3-kinase
PKC : Protéine kinase C
PLC : Phospholipase C
PIGF : Facteur de croissance placentaire
PMSF : Phenylmethanesulphonylfluoride
Po2 : Tension d'oxygène
RAS : Système rénine-angiotensine
RONS : Espèces réactives oxygénées et azotées
ROS : Espèces réactives oxygénées
S6Ks : Kinases S6
Scr-c : Kinase régulée par l'étirement de type c
SDS : Sodium dodécyle sulfate
sEng : Endogline soluble
SERCA : ATPase-Ca²⁺ sarco/endoplasmique
SERCA2 : SERCA de type 2
sFlt-1 : Récepteur soluble du VEGF
SOD : Superoxyde dismutase
SOD1 : Superoxide dismutase de type 1
SOD2 : Superoxide dismutase de type 2
SV : Volume d'éjection
TGFβ : Facteur de croissance transformant-β

*À ma mère, à ma famille, à Eric, à tous
ceux qui ont cru en moi*

Remerciements

Cette thèse de doctorat n'aurait jamais vu le jour sans l'aide que m'ont apportée les nombreuses personnes qui y ont participé, que ce soit de façon directe ou indirecte.

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Dre Julie L. Lavoie, pour avant toute chose m'avoir fait confiance et avoir cru que j'avais le potentiel nécessaire pour accomplir la tâche qu'elle allait me donner. Évidemment, je me dois de la remercier de m'avoir donné un si beau projet, auquel j'ai pu croire avec elle. Je la remercie aussi de l'encadrement et de l'enseignement qu'elle m'a fournis, ainsi que de m'avoir toujours poussée à en faire un peu plus, ce qui m'a permis d'acquérir de nombreuses connaissances, autant techniques que scientifiques. Également, je voudrais souligner que les trois années que j'ai passées dans son laboratoire ont non seulement été très formatrices, mais aussi très inspirantes et motivantes, puisque je me levais à chaque matin pour aller travailler avec une personne des plus déterminée à atteindre ses buts, et ce, malgré toutes les embûches que la science puisse apporter.

Je dois aussi exprimer ma gratitude à ma co-directrice, Dre Jolanta Gutkowska, pour tout ce qu'elle a apporté à ce projet, et aussi pour les bons mots, les encouragements et les critiques constructives. C'est un privilège pour une étudiante d'apprendre d'une personne ayant une si grande expérience, non seulement de la recherche et de la science, mais aussi de la vie en générale, et je l'en remercie.

J'ai aussi eu la chance d'être en contact avec plusieurs personnes qui ont facilité mon travail et qui ont allégé mes journées de par leur aide. Il est donc primordial pour moi de remercier Catherine Michel pour tout le travail qu'elle a effectué au sein de ce

projet en prenant soin de nos précieuses souris. Son organisation impeccable et son aide de tous les jours ont été des éléments clés dans la réussite de ce projet en plus d'écourter mes journées de façon considérable. Aussi, j'aimerais remercier Sandra Bisotto non seulement pour les expériences qu'elle a effectuées pour certaines parties du projet, mais aussi pour son aide au jour le jour dans le laboratoire. Au même titre, je tiens à souligner l'aide de Crina Solomon, Julie Bérubé, Caroline Monat ainsi qu'Emmanuelle Courville qui ont toutes quatre participé aux expériences qui ont permis l'écriture de cette thèse, je les en remercie.

Ce projet m'a aussi permis d'apprendre de nouvelles techniques et de bénéficier du savoir faire de plusieurs collègues. Il est important pour moi de remercier Ekatherina Stoyanova pour m'avoir patiemment appris à mesurer la fonction cardiaque de mes souris par échocardiographie. Aussi, je tiens dire merci au Dr Wang Dunghao pour l'aide qu'il m'a apporté avec plusieurs techniques, ainsi qu'au Dr Louis Gaboury pour le travail qu'il a effectué au niveau l'analyse histologique. De plus, je dois exprimer ma gratitude au Dre Cathy Vaillancourt ainsi qu'à son étudiante Andrée-Anne Lacasse pour le temps qu'elles ont accepté de mettre pour m'aider à compléter ce projet.

Mon parcours en recherche a commencé bien avant le début de ce doctorat et certaines personnes dont j'ai croisé le chemin avant ont eu une influence indéniable dans les choix que j'ai faits et sur la doctorante que je suis devenue. Je me dois par conséquent de remercier le Dr Guy Rousseau pour m'avoir initié à la recherche et pour m'avoir appris que ce monde en est un qui est difficile mais combien passionnant. De plus, il est important pour moi d'exprimer ma gratitude envers le Dr René Cardinal, pour avoir toujours cru en moi, pour m'avoir formée et pour son si grand intérêt pour la

transmission du savoir aux étudiants. Finalement, il me faut remercier le Dr Matthieu Boucher pour m'avoir tout appris du travail en laboratoire ainsi que de la méthode scientifique et pour avoir été en quelque sorte un modèle pour la jeune étudiante que j'étais à l'époque. C'est en grande partie grâce à ces trois personnes que j'ai pu être outillée pour entreprendre ce doctorat et je les en remercie sincèrement.

Entreprendre et mener à terme un projet d'une telle envergure auraient été impossible sans la présence dans ma vie de gens qui m'y ont non seulement encouragée, mais qui y ont cru avec moi. Je me dois de remercier mes amis si précieux qui ont toujours su me divertir quand j'en avais besoin, et qui ont toujours été présents, autant pour se réjouir lors des bons moments que pour m'aider à prendre des décisions difficiles et pour me motiver quand c'était nécessaire. Merci à Marie-Ève et Philippe pour avoir su trouver les bons mots depuis toujours. Merci aussi à Jess et Martine pour avoir fait ce long parcours universitaire à mes côtés, vos succès m'ont toujours inspirée. Merci à Isa, d'avoir simplement été là, mon admiration pour ta force a été une source de motivation à chaque jour.

J'ai eu la chance de grandir au sein d'une famille qui a tout fait pour me permettre d'en arriver où j'en suis aujourd'hui. J'ai eu la chance d'avoir des parents qui m'ont toujours appuyée et poussée à donner le meilleur de moi-même et qui m'ont enseignée à ne jamais me contenter de moins parce que c'était plus facile. J'ai eu le privilège d'avoir des parents qui ont toujours tout mis en œuvre pour que mes études soient mon unique préoccupation. Je veux remercier ma petite sœur, Sophie, d'avoir été si compréhensive face à une grande sœur qui n'avait pas toujours autant de temps qu'elle aurait voulue à offrir. Merci papa d'avoir toujours compris l'importance que ces

études avaient pour moi. Merci Marc, pour ton appui, pour ton aide, pour toujours avoir été là.

Je me dois aussi de remercier la personne qui m'a accompagnée à chaque jour de ce projet depuis plus de 3 ans. Eric, merci avant tout de m'avoir supportée et d'avoir été si compréhensif. Merci d'avoir été là dans mes moments de découragement et de fatigue autant que dans les moments de réussite et de bonheur. Merci d'avoir compris pour les soirées, les weekends et parfois les nuits de travail. Mais surtout, merci d'y avoir cru, merci de toujours croire à mes objectifs qui sont à chaque jour un peu plus grands. Merci d'être si fière de moi, merci pour la confiance en moi que je vois dans tes yeux à tous les jours, sans toi, tout semblerait plus difficile.

Finalement, d'entre toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce projet, je tiens à remercier la personne à qui j'ai dédié cette thèse, la personne qui est là depuis toujours. Merci maman, de toujours avoir été là, de m'avoir toujours appuyée, de toujours avoir été si fière de moi et de toujours avoir cru en moi, beaucoup plus que je ne savais le faire moi-même. Merci de m'avoir fait comprendre très tôt, qu'il n'y avait rien au monde que je n'étais pas capable de faire, qu'évidemment je devrais travailler fort, mais que j'avais la capacité d'absolument tout accomplir. Merci.

Introduction

La prééclampsie est une condition pathologique sévère liée à la grossesse. Bien que des gènes distincts et certains facteurs de risque y aient été associés, les mécanismes via lesquels la maladie se développe sont encore très peu connus. Elle survient sans qu'on en connaisse l'origine, et mis à part l'accouchement, aucun traitement n'est connu pour protéger les mères et leur fœtus des conséquences de celle-ci.

Étant donné que les habitudes de vie des individus ont un effet important sur le développement de plusieurs maladies qui affectent le système cardiovasculaire, nous pensons que la diète, le stress et l'entraînement physique peuvent avoir un rôle à jouer dans le déclenchement de la prééclampsie.

Le but de cette thèse de doctorat est d'étudier les mécanismes moléculaires à l'origine de la prééclampsie dans des modèles murins. En plus de caractériser un nouveau modèle animal de la maladie fondé sur un facteur de risque de celle-ci, nous évaluerons l'impact de la diète, d'un stress d'immobilisation et de l'entraînement physique, sur le développement de cette condition pathologique.

Chapitre 1- La grossesse

1.1– Implantation et placentation

Lors de la grossesse, chez la femme comme chez tous les mammifères, un nouvel organe est formé. Le placenta est un tissu formé des cellules du fœtus et de sa mère, et qui est irrigué par le sang maternel. Il a pour fonction d'apporter nutriments et oxygènes au fœtus en croissance, en plus de le libérer des déchets métaboliques et du dioxyde de carbone qu'il génère. Les souris, les rats, les cochons d'Indes ainsi que les lapins partagent avec l'humain le même type de placentation, soit la placentation hémochoriale (Figure 1)(1). Ce type de placentation est caractérisé par une proximité entre le sang maternel et celui du fœtus. En effet, pour qu'une molécule passe d'un compartiment à l'autre, elle doit traverser la barrière placentaire, composée d'une couche de trophoblastes et d'endothélium à l'intérieur des villosités déciduales(1). Le placenta est irrigué par l'artère utérine principale se séparant en artérioles qui nourrissent l'espace où les échanges pourront être réalisés avec le compartiment fœtal.

L'artère principale de l'utérus doit subir un remodelage afin d'irriguer adéquatement le placenta et ainsi subvenir aux besoins du fœtus. Chez la femme enceinte, le diamètre de l'artère utérine est doublé à 21 semaines de grossesse et la vitesse du flot sanguin qui la traverse est aussi augmentée(2).

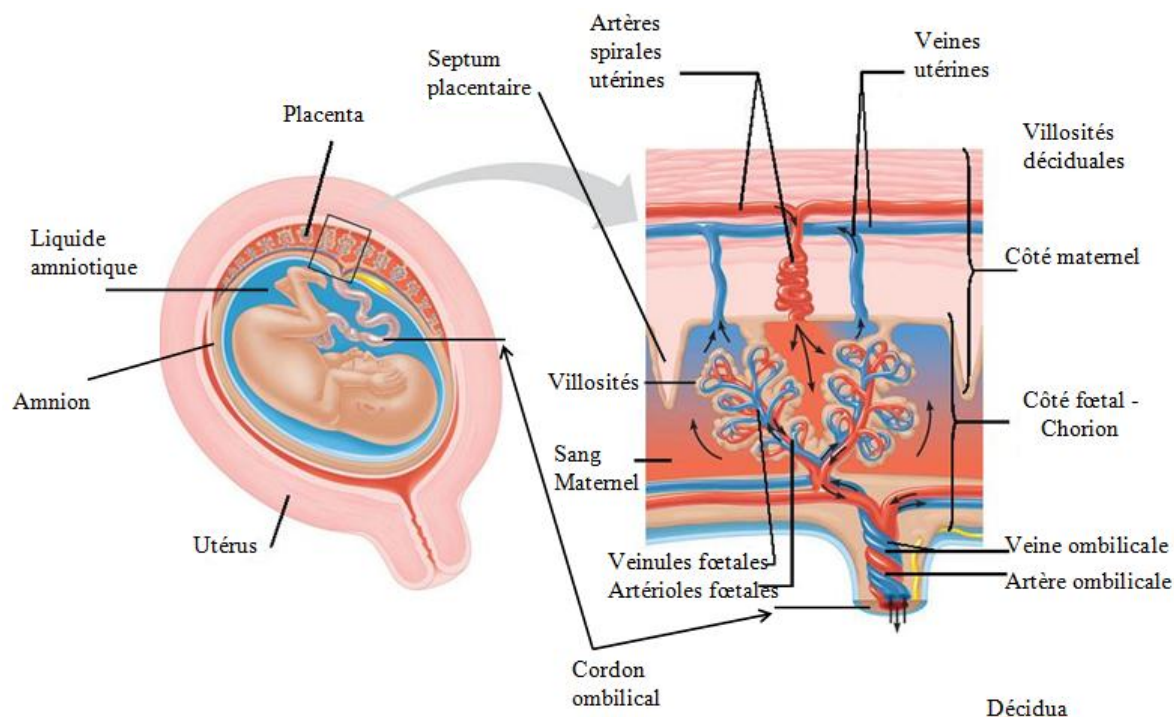


Figure 1. Placenta hémochoriale.

Anatomie du placenta chez l'humain où le sang de la mère entre en contact avec les villosités flottantes ou ancrées, permettant ainsi les échanges entre la mère et son fœtus via différents types de trophoblastes.

(http://bio1152.nicerweb.com/Locked/media/ch46/46_16Placenta.jpg)

Les artères spiralées de l'utérus sont aussi remodelées drastiquement suite à l'invasion trophoblastique qu'elles subissent. En effet, les trophoblastes fœtaux migrent dans la lumière artérielle pour y remplacer l'endothélium ainsi que les cellules musculaires lisses qui les constituent normalement (Figure 2)(1). Suite à leur envahissement, les artères spirales perdent leur capacité à se contracter ainsi qu'à être résistantes et laissent par conséquent passer un flot sanguin plus important et régulier(3).

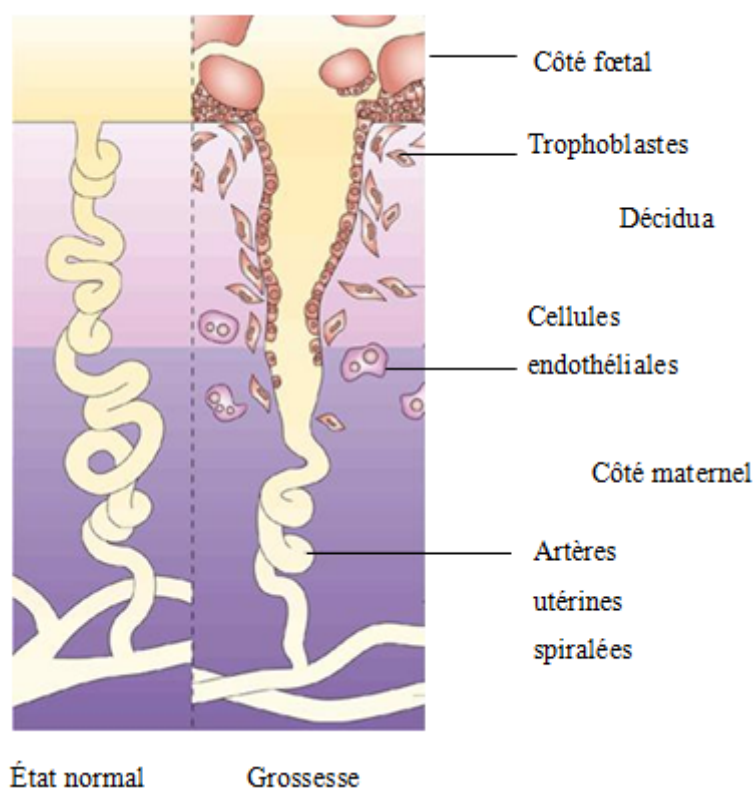


Figure 2. Invasion trophoblastique.

Les trophoblastes endovasculaires envahissent les artères spirales de l'utérus et remplacent l'endothélium maternel afin d'induire un remodelage favorable à une irrigation optimale du placenta(4).

Plusieurs mécanismes moléculaires modulent chacune des étapes d'implantation de l'embryon ainsi que de formation du placenta. Pour que l'implantation soit possible, l'endomètre de la mère doit être transformé en décidua(5). Chez l'humain, la décidualisation s'amorce avant la présence du blastocyste dans la cavité utérine(3). L'activation des récepteurs stéroïdiens, entre autre par la progestérone et l'œstradiol, joue un rôle important dans l'initiation des changements au niveau de l'utérus et ensuite dans la régulation des modifications utéro-placentaires tout au long de la grossesse(6). Les métalloprotéinases, les cytokines, les intégrines de

surface, le complexe majeur d'histocompatibilité ainsi que les trophoblastes eux-mêmes de manière paracrine, sont diverses molécules impliquées dans la signalisation permettant la décidualisation, l'invasion trophoblastique ainsi que la placentation(5). Au même moment, les modifications immunitaires qui caractérisent la grossesse, soit la prédominance de l'immunité humorale (Th2) sur l'immunité à médiation cellulaire (Th1), ont aussi lieu(3). Par conséquent, à cette étape, les cellules stromales de l'endomètre, les glandes et les vaisseaux de l'utérus, en plus des cellules immunitaires utérines sont modifiées pour former la décidua(6).

Le développement des villosités du placenta s'amorce dès que la nidation est complétée et se fait en trois étapes(6). Premièrement, les villosités primaires sont formées à partir du côté fœtal(6). Ces villosités sont ensuite envahies par du tissu conjonctif provenant de l'embryon, les transformant alors en villosités secondaires. Dès que des capillaires fœtaux peuvent être observés à l'intérieure de ces dernières, elles sont alors considérées comme étant des villosités tertiaires mésenchymateuses(6). Ces étapes sont répétées tout au long de la grossesse tant qu'il y aura angiogénèse du côté fœtal et donc que de nouvelles villosités pousseront pour agrandir l'arborisation. Certaines villosités iront s'ancrer à la membrane basale de l'utérus, alors que d'autres flotteront tout simplement dans le sang maternel. Les cellules couvrant les villosités sont produites par les cellules souches cytotrophoblastiques. Ces dernières recouvrent elles-mêmes les villosités et donnent naissance aux syncytiotrophoblastes, qui sont en contact avec le syncytium, ainsi qu'aux trophoblastes extravilleux qui iront envahir le stroma utérin(6). Les syncytiotrophoblastes en plus d'avoir une fonction endocrine

jouent un rôle de premier plan dans les échanges fœto-maternels(6). Une sous population des trophoblastes extravilleux, les trophoblastes endovasculaires, iront envahir les artères spiralées de l'utérus et leur feront subir un important remodelage en remplaçant l'endothélium qui les constituait(7).

1.1.1- Rôle de l'oxygène et de l'angiogénèse

Au cours des premières semaines de grossesse, la placentation se fait dans un environnement relativement hypoxique sous une tension d'oxygène (P_{O_2}) d'environ 20mm Hg(8). Ensuite, vers la 10^{ème} semaine, pour que les cytotrophoblastes passent d'un état prolifératif à un état invasif, un changement doit se faire au niveau de la P_{O_2} au cours de l'ouverture de l'espace intervilloux(9-11). Le facteur d'hypoxie (HIF-1) régule les effets de la P_{O_2} .(12) En début de grossesse, dans le placenta, l'expression de HIF-1 α est élevée tout comme celle du facteur de croissance transformant- β 3 (TGF β 3), qui inhibe la différenciation des trophoblastes. Cependant, leur expression est diminuée à partir de la 10^{ème} semaine(10). Il a été démontré sur des villosités en culture que l'augmentation de la pression d'oxygène diminuait l'expression de HIF-1 α et de TGF β 3, et que leur inhibition favorisait invasion trophoblastique extravilleuse(10). HIF-1 régule aussi l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), qui est exprimé en hypoxie et favorise l'angiogénèse et la vasodilatation qui est impliqué dans la vascularisation du placenta. Il a notamment été démontré que le VEGF transforme les cellules souches

hématopoïétiques en cellules endothéliales, et par conséquent est un effecteur direct de l'angiogénèse(13).

1.2- Changements physiologiques chez la mère

Tout au long de la grossesse, plusieurs changements hémodynamiques et métaboliques surviennent afin d'établir des conditions optimales pour le développement du fœtus ainsi que pour la santé de la mère.

Une activation du système rénine-angiotensine (RAS) accompagnée d'une importante baisse de la sensibilité aux vasoconstricteurs, principalement à l'angiotensine II (AngII) caractérise la grossesse normale(14). Au cours de la grossesse, les concentrations circulantes d'angiotensinogène, de rénine et de pro-rénine sont augmentées suite à la stimulation de leur synthèse par les œstrogènes maternels, et conséquemment, les concentrations d'AngII et d'aldostérone circulantes sont aussi augmentées(15). Bien que la grossesse soit associée à une élévation des concentrations plasmatiques des composantes de ce système, la réponse de l'endothélium(15) et du muscle lisse(16) vasculaire aux vasoconstricteurs y est significativement diminuée. En effet, malgré que les concentrations d'AngII soient doublées, aucune élévation de la pression n'est observée, au contraire, une diminution de celle-ci est associée à la grossesse. Cette résistance des femmes enceintes aux vasoconstricteurs peut en partie être expliquée par une contribution accentuée de l'angiotensine 1-7 (Ang-(1-7)) puisque l'expression de celle-ci est aussi augmentée

lors de la gestation. Cette composante vasodilatatrice du RAS est formée suite au clivage de l'angiotensine I par l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2)(17), par opposition à la formation d'AngII suite au clivage de l'angiotensine I par l'ACE (voir figure 3).

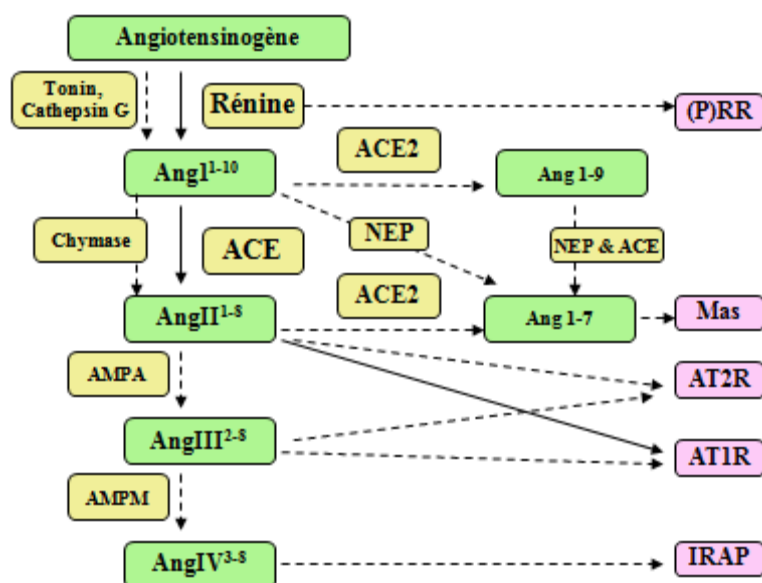


Figure 3. Le système rénine-angiotensine élargi tel qu'il est défini à ce jour.

Les flèches relient les peptides aux récepteurs qu'ils activent. Les flèches pleines représentent les réactions impliquées dans le RAS classique, alors que celles qui sont pointillées représentent le RAS élargi. **(P)RR** : Récepteur de la rénine; **Mas** : Mas oncogène – Récepteur de l'Ang 1-7; **AT2R** : Récepteur de type 2 de l'angiotensine; **AT1R** : Récepteur de type 1 de l'angiotensin ; **IRAP** : Aminopeptidase régulée par l'insuline – Récepteur de l'angiotensine IV; **AMPA** : Aminopeptidase A; **AMPM** : Aminopeptidase M; **ACE** : l'enzyme de conversion de l'angiotensine; **ACE2** : l'enzyme de conversion de l'angiotensine de type 2; **NEP** : Endopeptidase neutre(17).

La majorité des effets de l'AngII surviennent suite à l'activation du récepteur à l'angiotensine de type 1 (AT1), par exemple la vasoconstriction, la stimulation de l'aldostérone, de l'angiogénèse ainsi que de la croissance cellulaire (Figure 4). Toutefois, ce peptide reconnu pour ses propriétés vasoconstrictrices peut également

induire une réponse complètement opposée en activant les récepteurs à l'angiotensine de type 2 (AT2)(18). Le patron d'expression des récepteurs AT1 et AT2 a un impact sur la diminution de la pression artérielle lors de la gestation chez la souris(19).

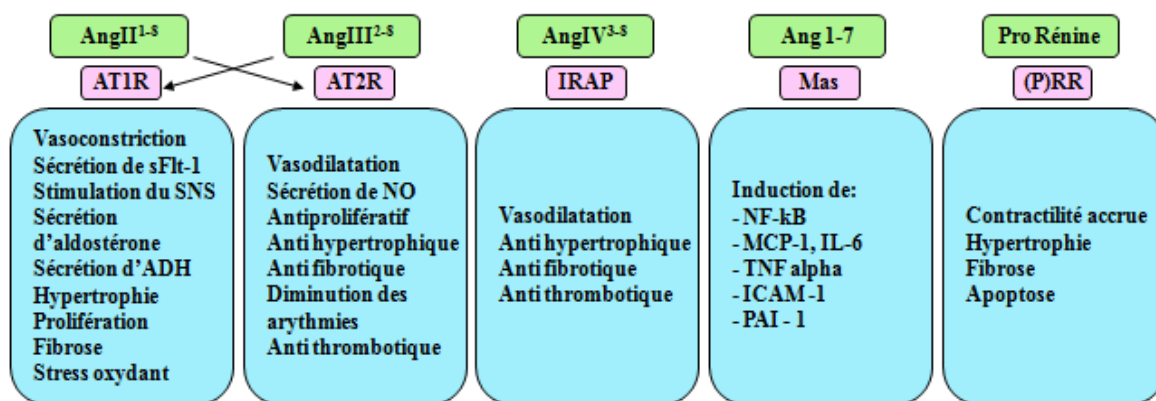


Figure 4. Effets induits par les différents peptides du système rénine-angiotensine via leurs récepteurs respectifs.

(P)RR : Récepteur de la rénine; **Mas** : Mas oncongène; **AT2R** : Récepteur de type 2 de l'angiotensine; **AT1R** : Récepteur de type 1 de l'angiotensin ; **IRAP** : Aminopeptidase régulée par l'insuline; **SNS** : Système nerveux sympathique; **ADH** : Hormone antidiurétique (vasopressine); **NF-κB** : Facteur nucléaire kappa activé dans les cellules B; **MCP-1**: Protéine-1 chimiotactique des monocytes; **IL-6** : Interleukine-6; **TNF alpha** : Facteur de nécrose tumoral alpha; **ICAM-1**: Molécule d'adhésion inter-cellulaire-1; **PAI-1**: Inhibiteur des activateurs de plasminogène(17).

Le récepteur à l'angiotensine IV (AngIV), l'aminopeptidase régulée par l'insuline (IRAP), est exprimé par plusieurs organes, dont le cœur et le placenta. L'IRAP a aussi été désignée comme étant l'ocytocinase puisqu'elle dégrade l'ocytocine (OT). Il a été observé que lors de la grossesse, le sérum et le placenta avaient tous deux la propriété de dégrader l'OT. En effet, l'IRAP est libérée dans la circulation et son activité est augmentée(20). Étant donné qu'une augmentation de l'OT provoquerait des contractions au niveau de l'utérus, l'IRAP participe au maintien

de l'homéostasie de la grossesse. De plus, l'IRAP dégrade certains vasoconstricteurs, notamment l'AngII.

Il est important de comprendre que si un RAS circulant agit de façon systémique, plusieurs organes ont leur propre RAS local(17). C'est le cas de la région utéro-placentaire où toutes les composantes du RAS sont exprimées au niveau de l'utérus, du placenta et des membranes fœtales(21)..

Le volume plasmatique de la femme enceinte en santé est augmenté de 45 à 55% par rapport à avant la grossesse, toutefois une diminution de la valeur de son hémocrite est aussi observée puisque l'augmentation du nombre de globules rouges n'est que de 20% à 30%(22). La synthèse systémique et rénale de monoxyde d'azote (NO) est augmentée(14). Le volume de perfusion des reins est augmenté, tout comme le taux de filtration glomérulaire et le flot urinaire, alors que la résistance vasculaire de ceux-ci est diminuée(23;24). Ces événements reflètent en partie la diminution de la résistance périphérique observée chez la femme enceinte par rapport à avant la grossesse, bien que les mécanismes menant à celle-ci soient encore mal compris(25). Cette réduction induit une augmentation du débit cardiaque(24) qui est maintenue tout au long de la grossesse pour atteindre un maximum d'environ 27% à 50% à la fin du second trimestre par rapport aux valeurs de débit pré-grossesse(26). L'augmentation du volume sanguin induit subséquemment une augmentation du volume d'éjection systolique en début de grossesse qui s'accroît jusqu'à la fin du second trimestre pour

ensuite se stabiliser(27), ce qui est un des facteurs contribuant à l'augmentation du débit cardiaque.

En parallèle avec la baisse de résistance périphérique, une diminution de la pression artérielle est observée vers la fin du premier trimestre de la grossesse, cette baisse s'accroît et persiste jusqu'à la fin du second trimestre(23). La pression remonte ensuite graduellement jusqu'à l'accouchement où la pression est généralement revenue au même niveau qu'avant la grossesse(28). Dans le même ordre d'idée, pour compenser la baisse de pression artérielle, la fréquence cardiaque est plus élevée au cours des premiers mois de grossesse et continue d'augmenter jusqu'à l'accouchement afin de soutenir la perfusion de tous les organes en maintenant le débit cardiaque(27).

Ces changements hémodynamiques mènent à une hypertrophie cardiaque physiologique chez la mère, et l'augmentation de la masse du cœur est principalement due à un épaississement de la paroi du ventricule gauche en réponse à l'accroissement du volume sanguin(14). La fonction ventriculaire améliorée est caractérisée par une augmentation de la pré-charge, une diminution de la post-charge ainsi que par un accroissement de la contractilité intrinsèque du myocarde(14). Cette hypertrophie étant réversible, la masse du cœur revient à ce qu'elle était avant la grossesse une fois celle-ci terminée.

Chapitre 2- La prééclampsie

2.1- Symptômes

Le diagnostic de la prééclampsie survient suite aux nouvelles apparitions d'hypertension artérielle, au dessus de 140/90mmHg, et de protéinurie supérieure à 300mg/j après 20 semaines de grossesse(29). L'atteinte plus ou moins sévère d'autres organes de la mère ne sont pas des éléments diagnostiques mais sont généralement des caractéristiques de la maladie. Il est donc important de comprendre que même si de nombreux symptômes caractérisent la prééclampsie, ils ne sont pas observés de façon homogène chez les différentes femmes atteintes. Chez les femmes hypertendues, un diagnostic de prééclampsie superposée à de l'hypertension chronique, est donné s'il y a une augmentation significative de la pression au cours de la grossesse par rapport au niveau de base accompagné d'une nouvelle apparition de protéinurie(30).

En comparaison avec une grossesse normale, en plus d'avoir une pression artérielle augmentée plutôt que diminuée, les femmes souffrant de prééclampsie ont un volume sanguin amoindrie ainsi qu'un hémocrite augmenté(31). Cette réduction du flot sanguin compromet la perfusion systémique(32). En effet, en contradiction avec la réponse normalement observée chez la femme enceinte, une dysfonction endothéliale, définie par une sensibilité accrue aux vasoconstricteurs est souvent associée à la prééclampsie(33;34). La perfusion est aussi compromise par l'activation de la cascade de coagulation, puisque cette dernière induit de la coagulation intravasculaire et des

microthrombus, ainsi que par l'augmentation de la perméabilité vasculaire menant à la présence d'œdème(32). L'irrigation inadéquate des organes en périphérie peut mener à une nécrose ou une hémorragie, par exemple au niveau du foie, du cerveau et des surrénales(32). De plus, la prééclampsie sévère peut engendrer l'apparition de convulsions ou du syndrome d'anémie hémolytique et cytolyse hépatique accompagnée de thrombopénie (HELLP)(35).

L'hypertension artérielle qui caractérise la prééclampsie cause une surcharge au niveau du cœur modifiant le patron d'hypertrophie cardiaque ordinairement noté lors de la grossesse. Conséquemment, une élévation de la post-charge accompagnée d'un débit diminué suggère une hypertrophie cardiaque pathologique(36).

Les dommages causés aux différents organes atteignent aussi les reins. Cette atteinte rénale se caractérise par une enflure au niveau de l'endothélium des capillaires glomérulaires et des cellules mésangiales, obstruant ainsi la lumière des capillaires(32). Cette endothéliose est typique de la prééclampsie(37).

La condition pathologique du placenta est un symptôme typique de la prééclampsie. L'invasion trophoblastique inadéquate des artères spiralées de l'utérus, menant à un remodelage inadapté de celles-ci, définit cette condition pathologique(38-41). En effet, des biopsies de placentas provenant de mère souffrant de prééclampsie ne présentaient pas le remodelage observé dans les placentas provenant de mères ayant eut une grossesse normale(38;40). Une mauvaise perfusion du placenta en résulte

donc, ce qui a des répercussions non seulement sur le placenta lui-même, mais par enchaînement, sur le fœtus puis sur la mère.

Les conséquences fœtales résultant de la prééclampsie varient d'une grossesse à l'autre, notamment en fonction de la sévérité de la maladie développée. Les accouchements prématurés sont fréquents étant donné qu'aucun autre traitement n'est connu pour enrayer les symptômes qui menacent la vie de la mère. Un fœtus souffrant de restriction de croissance intra-utérine (IUGR) qui, de surcroît, naît prématurément, présente forcément des lacunes dans son développement, ce qui peut aussi avoir un impact sur sa croissance après la naissance. Entre autre, un délai au niveau du développement neuronale, pouvant affecter le quotient intellectuel(42), ainsi que des maladies chroniques au niveau des poumons(43) peuvent en résulter. Il a été rapporté que les adultes ayant subi une IUGR au début de leur vie, ont un risque accru de développer de l'hypertension artérielle, de la dyslipidémie, de l'obésité ainsi qu'une résistance à l'insuline(44).

2.2- Facteurs de risque de la prééclampsie

2.2.1 Épidémiologie

La prééclampsie se manifeste chez 5 à 10% des femmes enceintes. Toutefois, il a été remarqué que cette condition pathologique est plus souvent observée lors de première grossesse(45), ou de première grossesse avec un certain géniteur. En effet, un lien entre une exposition limitée au sperme du père avant la conception a été fait avec

la prévalence de la maladie, ce qui pourrait expliquer la fréquence de la prééclampsie chez les filles de moins de 20 ans, ainsi que chez les femmes enceintes suite à une injection de sperme obtenu chirurgicalement(46). Également, une incompatibilité génétique entre les parents, menant à une réaction immunogène est considérée comme étant une cause potentiel du déclenchement de la maladie chez certaines femmes. En faveur de cette hypothèse immunitaire, il a été remarqué que les femmes enceintes, dont le géniteur avait auparavant généré une grossesse prééclamptique, étaient plus à risques. De plus, les antigènes fœtaux générés lors d'une première grossesse avec un géniteur protègent pour les grossesses subséquentes avec ce même père(47). Les grossesses multiples sont également plus à risque(48). De plus, la prééclampsie a une prévalence accrue chez les femmes obèses, hypertendues chroniques, diabétiques, ou souffrant préalablement de thrombophilie ou de dyslipidémie(49). Tel que mentionné auparavant, la prévalence de la maladie est aussi plus élevée au sein de certains groupes ethniques, par exemple les femmes noires(50).

2.2.2 Facteurs génétiques

L'hypothèse, selon laquelle des facteurs génétiques sont impliqués dans le développement de la prééclampsie est supportée par l'observation que les filles de mères prééclamptiques ont un plus grand risque de développer cette condition(51). Le risque est aussi plus élevé si la grossesse est engendrée par un père lui-même né d'une grossesse prééclamptique(52). La prééclampsie est une condition pathologique hétérogène dont les facteurs de risques sont multiples et variés. Il est donc raisonnable

de penser que plusieurs gènes distincts puissent être impliqués dans le développement de la maladie, en plus d'interagir avec de nombreux facteurs environnementaux et comportementaux. Il est toutefois important de tenir compte du fait que les facteurs non-génétiques ont une importance primordiale quant au déclenchement de la maladie(53).

L'activité du RAS est augmentée lors de la grossesse normale où il est responsable de la bonne régulation du volume des fluides et du tonus vasculaire, via la production de rénine, d'angiotensinogène (Agt), d'AngII et d'aldostérone. Contrairement à la grossesse normale, la grossesse affectée par la prééclampsie est caractérisée par une hypovolémie, et les concentrations de rénine sont inférieures à ce qu'elles devraient être. Il a été noté que chez la femme normale, 4% des Agt totaux dans le plasma sont de la forme ayant un poids moléculaire élevé (H-Aogen)(54). Ce niveau est augmenté chez les femmes enceintes normotendues (16%). Suite au clonage du gène de l'*Agt*, il a été observé que chez les femmes porteuses du variant T235, un plus haut taux d'Agt plasmatique et tissulaire était mesuré et qu'une association pouvait être faite avec la prééclampsie, comme avec l'hypertension essentielle(54). Par contre, les études faites sur les autres composantes du RAS, soit sur le gène de la rénine ou sur celui codant pour ACE n'ont pas été concluantes quand à l'association de ces gènes avec la maladie(52).

Outre les altérations au niveau du RAS, la dysfonction endothéliale qui caractérise la prééclampsie est définie par une augmentation de la sensibilité de

l'endothélium vasculaire aux vasoconstricteurs, ainsi qu'une réduction de sa réponse aux vasodilatateurs(55). Il a été proposé que la dysfonction endothéliale soit causée par des molécules réactives en provenance du placenta mal perfusé, telles les cytokines pro-inflammatoires et les espèces réactives de l'oxygène (ROS)(56). La relâche du NO dérivé de l'endothélium est augmentée lors de la grossesse, que cette expression est modulée par la transcription du gène de la synthase du NO endothéliale (eNOS) ou (NOS3), lui-même sous le contrôle des œstrogènes(57). Le groupe d'Arngrimsson a alors noté qu'une altération dans le gène de la eNOS, était impliquée dans la prédisposition favorisant les désordres hypertensifs de la grossesse(58). Parallèlement, il a été démontré qu'un polymorphisme au niveau du gène NOS3 était associé à un risque élevé de développer la prééclampsie(59).

Il est accepté que la thrombophilie est un facteur de risque de la prééclampsie, par conséquent plusieurs gènes candidats y ont été associés(60). En effet, la mutation du gène codant pour le facteur V Leiden, qui accélère la transformation de la prothrombine en thrombine, ainsi que celle du gène codant pour la prothrombine elle-même, ont une plus grande incidence chez les femmes souffrant de prééclampsie(61). Aussi, un variant du gène de la méthyltétrahydrofolate réductase (MTHFR), ainsi qu'un polymorphisme au niveau de l'inhibiteur de l'activateur plasminogène de type-1 (PAI-I), ont été liés à la prééclampsie(61-63). Toutefois, notre laboratoire a démontré que chez la souris, l'hyperhomocystéinémie induite par la délétion du gène de la MTHFR, bien qu'elle induisait une dysfonction endothéliale, n'était pas suffisante à elle seule pour induire les symptômes de prééclampsie(64) dans ce modèle, suggérant

que d'autres facteurs doivent entrer en ligne de compte pour déclencher cette condition pathologique. Nous avons d'ailleurs démontré que l'apport en acide folique de la diète induisait l'apparition de certains de symptômes chez la souris, dont la protéinurie, l'IUGR et la réduction du nombre de bébés par portée(64).

Il a été démontré que chez les femmes prééclamptiques l'augmentation de la peroxydation des lipides observée en circulation est supérieure à celle de la grossesse normale(65). De plus, une diminution de la capacité antioxydante causée par une réduction de la catalase (CAT), la glutathione peroxydase (GPX) et principalement la superoxyde dismutase (SOD), est associée à la prééclampsie, causant ainsi un déséquilibre de l'équilibre entre le stress oxydatif et les antioxydants protecteurs(65). Un polymorphisme au niveau du gène de la glutathione S-transférase (GST) a été associé à la prééclampsie(66). Ce gène code pour l'isoforme de la GST qui est principalement exprimé dans le placenta. La mutation induit une diminution de l'expression du gène et, par conséquent, une diminution de l'activité de cet antioxydant. Dans le même ordre d'idée, la libération de cytokines proinflammatoires du placenta vers la circulation a été associée à la prééclampsie(67). Par exemple, la libération du facteur tumoral de nécrose-alpha (TNF- α) par le placenta dans la circulation endommage l'endothélium vasculaire(68). Il a été remarqué que l'expression de l'ARNm du TNF- α était significativement plus élevée dans les leucocytes de femmes prééclamptiques par rapport à celles qui avaient une grossesse normale(68).

Une autre hypothèse envisagée pour expliquer la source de la prééclampsie est celle de la reconnaissance par la mère des antigènes dérivés du père qui sont présents chez les fœtus ainsi que dans le placenta(69). Les antigènes de leucocytes humains II DR (HLA-DR) sont impliqués dans cette reconnaissance. Il a été observé qu'il y avait une augmentation significative des homozygotes pour HLA-DR chez les deux parents ayant engendré une grossesse prééclamptique en comparaison avec les contrôles(70). Ceci suggère que le manque de compatibilité génétique entre les parents serait à l'origine du déclenchement de la maladie dans certains cas(70).

De plus, des études de *scanning* de l'étendue du génome ont été faites afin de trouver des gènes candidat pour la prééclampsie(52). Un locus de susceptibilité maternelle pour la prééclampsie a été révélé sur le chromosome 2, et ce à différentes positions chez les islandaises(71), chez les australiennes et néo-zélandaises(72), ainsi que chez les finlandaises(73;74) et chez les norvégiennes(75). Étant donné que les norvégiennes et les finlandaises, qui ont des ancêtres différents des australiennes et des néo-zélandaises, ont une susceptibilité commune à développer la prééclampsie en lien avec ce locus, il est possible que ce dernier ait un rôle à jouer dans le développement de cette maladie(75). Plusieurs gènes potentiellement impliqués se trouvent dans cette région, notamment celui du récepteur 2A de l'activin A(75). Cette observation est intéressante puisque l'activin A fait partie de la famille des TGF- β , qui sont impliqués dans la différenciation, la prolifération ainsi que l'apoptose au niveau de la cellule. L'activin A et son récepteur sont exprimés au niveau du placenta, tel qu'observé en culture dans des explants de villosités chorioniques provenant de femmes

enceintes(76), et permettent la prolifération et la différenciation des trophoblastes ainsi que la décidualisation(77). Les concentrations circulantes et placentaires d'activin A sont augmentées chez les femmes prééclamptiques par rapport aux femmes ayant une grossesse normale(78-80), suggérant une réponse compensatoire en réponse à la diminution de l'expression du récepteur. De plus, des patients souffrant de maladies cardiovasculaires ont des niveaux circulants élevés d'activin A et une diminution de l'expression du gène de son récepteur(81), suggérant un lien entre l'activin A et les maladies cardiovasculaires. Des études doivent encore être produites afin de mieux comprendre les liens entre ce locus, les gènes potentiellement impliqués, la protéine ainsi que son récepteur.

2.2.3 Impacts de la diète, du stress et de l'entraînement physique

Puisqu'aucun traitement n'est encore connu pour enrayer les symptômes de la prééclampsie, les efforts de la recherche se sont non seulement concentrés sur les cibles pharmacologiques potentielles, mais aussi sur la prévention. L'étude de la prévention par la diète s'est étendue des suppléments alimentaires, notamment les antioxydants, les huiles de poissons et certaines vitamines, à l'excès de sodium et de l'apport de protéines dans l'alimentation(49). Les conclusions de ces études, si peu nombreuses soient telles, sont décevantes, ne démontrant aucun effet bénéfique significatif autant pour la prévention que pour la promotion de la maladie(82).

Les femmes qui vivent dans un environnement stressant, par exemple de par leur emploi, ainsi que les femmes ayant des personnalités plus stressées, étaient plus à risque d'accouchements prématurés que les femmes qui n'avaient pas vécu des situations de stress semblables au cours de leur grossesse(83). Il a été suggéré que cet effet du stress sur la grossesse pouvait être dû soit à une mauvaise hygiène de vie et à un comportement inadéquat, soit à une hormone de stress relâchée dans l'organisme, ou soit à l'influence de facteurs psycho-immunologiques. Il a été observé que les femmes subissant un stress psycho-social ont une production de cytokines pro-inflammatoires et de protéine C-réactive augmentée au cours de leur grossesse et que la production des cytokines par les lymphocytes est accrue en fin de grossesse(84). Ceci est aussi observé chez les femmes souffrant de prééclampsie et non lors d'une grossesse normale(85). Le stress est par conséquent un élément à considérer quant aux facteurs de risques de la prééclampsie.

2.3- Mécanismes proposés pour le développement de la prééclampsie

2.3.1 Défaut d'implantation placentaire

La prééclampsie est une maladie qui disparaît après l'accouchement et qui peut même être observée lors de grossesses molaires, c'est-à-dire un placenta sans fœtus(86). De plus, la prééclampsie est plus fréquente lors de grossesses multiples, donc où la masse placentaire est élevée(87). L'hypothèse la plus répandue pour expliquer l'apparition de la prééclampsie chez la femme est celle selon laquelle une

mauvaise placentation en serait l'origine. Un remodelage inadéquat des artères spiralées de l'utérus mènerait à une perfusion insuffisante du placenta, induisant de l'hypoxie, voir de l'ischémie dans les cas les plus sévères. La libération de molécules inflammatoires et réactives, notamment les radicaux libres, dans la circulation de la mère suite à cette insulte causerait la dysfonction endothéliale associée à cette condition pathologique, permettant ainsi l'enchaînement des événements pathologiques caractérisant la maladie. Cette hypothèse pourrait aussi expliquer les symptômes fœtaux de la prééclampsie puisque une mauvaise perfusion du placenta aurait nécessairement pour conséquence un apport inadéquat de nutriments et d'oxygène au fœtus. Toutefois, l'IUGR n'est pas toujours présente lors de la prééclampsie suggérant que l'atteinte placentaire puisse être plus ou moins sévère ou que des mécanismes compensatoires peuvent parfois être induits afin que la croissance du fœtus ne soit pas hypothéquée.

2.3.1.1 Histologie des placentas de femmes souffrant de prééclampsie

Une étude clinique a rapporté que les mères qui étaient destinées à développer une prééclampsie avaient généralement un flot utéro-placentaire réduit de 50 à 70% par rapport aux femmes qui allaient avoir une grossesse normale(88). Des altérations placentaires typiques ont été observées dans les placentas provenant de grossesses prééclamptiques. Une de ces caractéristiques est que le remodelage vasculaire nécessaire à une perfusion adaptée du placenta n'a pas lieu(89). Par exemple, il y a

préservation du tissu musculaire et élastique des artères spiralées ce qui a pour conséquence de maintenir le calibre restreint et vasoactif de ces vaisseaux, compromettant la perfusion nécessaire pour combler la demande du fœtus(89). Les trophoblastes endovasculaires ne parviennent pas à jouer leur rôle de remodeler les artères spiralées, en plus des trophoblastes interstitiels, qui eux, sont aussi moins nombreux dans les placentas associés à la prééclampsie(90). De plus, ces placentas sont aussi caractérisés par de l'hyperplasie, une désorganisation médiale ainsi que de la vacuolisation endothéliale(90). Une autre distinction définissant les vaisseaux des placentas de mères prééclamptiques est l'athérose, soit la présence de cellules spumeuses, de nécrose fibrinoïde ainsi que d'infiltration lymphocytaire périvasculaire(91). Cette particularité est aussi observée dans les vaisseaux de reins et de cœurs transplantés rejetés, suggérant une réponse immunologique inadéquate du fœtus(89). Toutes ces anomalies au niveau des vaisseaux irrigants le placenta sont corrélées avec une réduction du flot sanguin, et sont associées à la prééclampsie(92). Des lésions thrombotiques et vasculaires ont été observés autant au niveau des vaisseaux du côté fœtal du placenta, qu'au niveau des villosités ainsi que dans l'espace intervilloux(89). La thrombose utéro-placentaire caractérise, et par conséquent offre un lien, entre plusieurs conditions pathologiques associées à la grossesse, notamment, la prééclampsie, les accouchements prématurés, les fausses couches ainsi que l'IUGR(93). Outre les altérations spécifiquement vasculaires, les placentas prééclamptiques se distinguent aussi par une accélération de la ramification des villosités, de la présence de petites villosités sclérosées, de la perte de villosités

intermédiaires, d'une abondance de nœuds syncytiaux ainsi que d'un élargissement de l'espace intervillositaire(94).

2.3.1.2 Hypoxie et vascularisation placentaire

Les causes à l'origine de l'hypoxie, voir à de l'ischémie placentaire, sont encore peu connues. L'expression caractéristique de certains facteurs par le placenta a été proposée comme pouvant en être la cause, mais la question de la séquence temporelle demeure. En effet, le plus grand défi est de comprendre si l'expression de ces facteurs est la cause ou la conséquence de la perfusion inadéquate et donc, de l'hypoxie(88). Tel qu'observé par immunomarquage sur des biopsies de placentas, l'invasion des artères spiralées est absente ou superficielle chez les femmes prééclamptiques et le rôle de pseudo-vasculogénèse des trophoblastes n'est pas rempli(95). Aggravant l'ischémie, une diminution du ratio protéique de prostacycline (PGI₂) sur le thromboxane A₂ (TxA₂) peut augmenter la vasoconstriction et l'agrégation de plaquettes dans la région(96). L'un des facteurs qui est surexprimé, autant au niveau du gène que de la protéine, par ces placentas est le récepteur soluble du VEGF, le sFlt-1(97). La surexpression tardive de sFlt-1 par le placenta est une des causes potentielles de l'hypoxie observée générant les altérations subséquentes discutées précédemment. En faveur de cette hypothèse, les concentrations circulantes de sFlt-1 ont été rapportées comme étant significativement augmentées en prééclampsie(98). Le sFlt-1 se lie au VEGF en circulation et l'empêche de se lier à son récepteur tissulaire, le sFlk-1 et d'ainsi induire ses effets angiogéniques et de

perméabilité vasculaire(99). Ce n'est toutefois pas chez toutes les femmes souffrant de prééclampsie que les concentrations circulantes de sFlt-1 sont significativement accrues en fin de grossesse, et à l'inverse certaines femmes dont les concentrations circulantes de sFlt-1 étaient significativement élevées ne développaient pas la prééclampsie(98;100). La stimulation de l'expression de sFlt-1 est entre autres induite par certaines cytokines pro-inflammatoires le $\text{TNF-}\alpha$, la thrombine ainsi que l'interleukine 1-bêta ($\text{IL-1}\beta$)(101). Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'AngII via l'activation du récepteur AT1 induit la sécrétion de sFlt-1 par les villosités des trophoblastes, autant chez l'humain que chez la souris(102). Cette induction se fait via la voie de la calcineurine(102). Dans le même ordre d'idée, les auto-anticorps du récepteur AT1 de l'angiotensine (AT1-AA) via l'activation de ce même récepteur induisaient pareillement la synthèse et la sécrétion de sFlt-1, en plus d'induire une vasoconstriction(103). L'effet des AT1-AA et de l'AngII ont été démontrés comme étant additifs(103).

2.3.2 Dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale se définit comme étant l'incapacité des cellules endothéliales vasculaires de répondre adéquatement à un agent vasomodulateur en induisant une contraction ou une relaxation du muscle lisse vasculaire(104). Les femmes souffrant de prééclampsie ont généralement une dysfonction au niveau de l'endothélium vasculaire qui se manifeste par une réponse inadéquate à de celui-ci aux substances vasoactives(105). La prééclampsie se définit entre autre par une sensibilité

accrue aux vasoconstricteurs, notamment à l'AngII, tel que démontré en administrant cette substance à des femmes enceintes dont la grossesse était normale ou prééclampsique(34). Une réponse inadaptée à certains vasodilatateurs tels le NO et les prostaglandines, a aussi été observée(106). La vasodilatation dépendante de l'endothélium est aussi compromise dans des artères isolées de femmes souffrant de prééclampsie(107-110). Dans le même ordre d'idée, la réponse de l'endothélium à la bradykinine comme à l'acétylcholine est réduite dans les artères isolées de femmes prééclampsiques en comparaison avec celles de femmes ayant eu une grossesse normale(108;110;111). Les concentrations d'endothéline (ET) sont accrues autant en circulation que dans la veine utérine chez les femmes souffrant de prééclampsie en comparaison avec celles qui ont une grossesse normale(112). Cependant, la vasoconstriction induite par l'ET lors de la prééclampsie semble ne pas être toujours augmentée, ce qui peut être dû à une modification de l'expression de ses récepteurs (55;113).

Il a été démontré que le VEGF compromettait la vasodilatation dépendante de l'endothélium à un niveau similaire à ce qui est observé en prééclampsie dans des artères isolées(114). De plus une corrélation entre l'augmentation des concentrations circulantes de VEGF et l'élévation de la pression artérielle a été rapportée(115). Les concentrations de VEGF ont été rapportées comme étant augmentées en prééclampsie(115;116), cependant certains n'ont pu observer cette élévation(117;118). Ces différences peuvent être dues au fait que l'augmentation de son récepteur soluble, le sFlt-1, est si fulgurante lors de la grossesse que la liaison de ce dernier au VEGF

empêche d'observer l'élévation du VEGF total si la technique utilisée ne permet que de mesurer le VEGF libre(55;119). Ce qui explique que seuls les groupes mesurant le VEGF total, et non le VEGF libre, ont observé une augmentation(119). Le VEGF libre peut se lier à son récepteur tissulaire et favoriser l'angiogénèse et la perméabilité vasculaire(55). Le rôle du VEGF en prééclampsie reste encore à déterminer.

2.3.3 Altération du système rénine-angiotensine

Le RAS est un important médiateur de la pression artérielle ainsi que de l'homéostasie du sodium et des fluides. Une augmentation de son activité a été associée à l'hypertension artérielle, à la rétention de sodium ainsi qu'à l'hyperaldostéronémie(18). L'inhibition de ce système est d'ailleurs une cible pharmacologique de choix pour traiter l'hypertension artérielle, soit par les bloqueurs des récepteurs AT1, soit par les inhibiteurs de ACE ou plus récemment via l'inhibition de la rénine(17). Afin de mieux comprendre l'implication du RAS dans le développement de la prééclampsie, les interactions entre ses différentes composantes sont illustrées à la Figure 3.

En prééclampsie, la régulation des composantes de RAS est complètement chamboulée. Les concentrations d'AngII qui devraient normalement être augmentées sont inchangées ou diminuées, cependant une sensibilité accrue à cette substance est observée(18). L'activité plasmatique de la rénine et de l'aldostérone est

considérablement moins accrue que lors d'une grossesse normale, tout comme l'expression de l'Ang (1-7)(120). L'augmentation de l'expression des récepteurs B2 de 4 à 5 fois observée sur les plaquettes ainsi que dans les vaisseaux omentaux de femmes prééclamptiques favorise la dimérisation avec le récepteur AT1 et l'expression de l'hétérodimère amplifie la réponse à l'AngII(121).

Une diminution des concentrations circulantes de l'IRAP est observée chez les femmes ayant une grossesse prééclamptique en comparaison avec les femmes dont la grossesse est normale(20). La diminution de l'IRAP en prééclampsie est conséquente avec le fait que cette dernière est principalement synthétisée par les syncytiotrophoblastes et qu'une nécrose de ceux-ci est observée en prééclampsie(20). Les effets de l'IRAP ne se restreignent pas à la dégradation de l'AngII et de l'OT, en effet l'IRAP dégrade aussi la vasopressine(122).

Plusieurs études ont démontrées que les femmes souffrant de prééclampsie développaient des AT1-AA(123). Ces anticorps ont une affinité très élevée pour le récepteur AT1 et d'infimes quantités sont suffisantes pour induire une puissante réponse(103). En plus d'avoir la propriété d'activer par eux-mêmes les récepteurs AT1, les AT1-AA favoriseraient aussi la sensibilité du récepteur à l'AngII entre autre en stabilisant l'homodimérisation de celui-ci(103). De plus, tel que résumé à la figure 4, l'activation d'AT1, que ce soit par l'AngII ou par les AT1-AA, induit la sécrétion de sFlt-1 et favorise la production de radicaux libres via l'activation de la NADP(H) oxydase(103). Le sFlt-1 en trop grande quantité empêche le VEGF d'aller se lier à son

récepteur tissulaire pour favoriser la perméabilité vasculaire et l'angiogénèse nécessaires physiologiquement. Il a été démontré qu'une grande partie des femmes souffrant de prééclampsie avait des taux plasmatiques de sFlt-1 anormalement élevés. Il a aussi été remarqué au cours de plusieurs études chez les patients traités avec les inhibiteurs de VEGF que ce traitement pharmacologique induisait de la protéinurie. La relâche de radicaux libres et de facteurs inflammatoires par le placenta hypoxique sera discutée en détails aux deux prochains points.

2.3.4 Stress oxydant

Les ROS sont des molécules de signalisation importantes impliquées dans plusieurs processus biologiques. Lorsque ces molécules sont équilibrées adéquatement avec d'autres qui sont antioxydantes, elles jouent un rôle clé au sein des mécanismes physiologiques impliqués dans la grossesse normale(124). En effet, la formation et le remodelage au niveau des vaisseaux de l'utérus ainsi que du placenta, autant que la croissance et la formation du fœtus, sont tous des événements qui génèrent une certaine quantité de radicaux libres, mais qui sont bien contrôlés par la présence et l'activité des enzymes antioxydantes afin que la production de ces espèces réactives ne devienne pas délétère(124). Le maintien de l'équilibre entre les radicaux libres et les espèces antioxydante est donc important (Figure 5).

Des homogénats de tissus placentaires provenant de mères atteintes de prééclampsie révèlent une activité restreinte de la superoxide dismutase(125) ainsi que

de la glutathionne peroxydase(126). Une augmentation de l'immunomarquage de la nitrotyrosine dans l'endothélium vasculaire est aussi observée au niveau des villosités de placentas provenant de mères souffrant de prééclampsie(127).

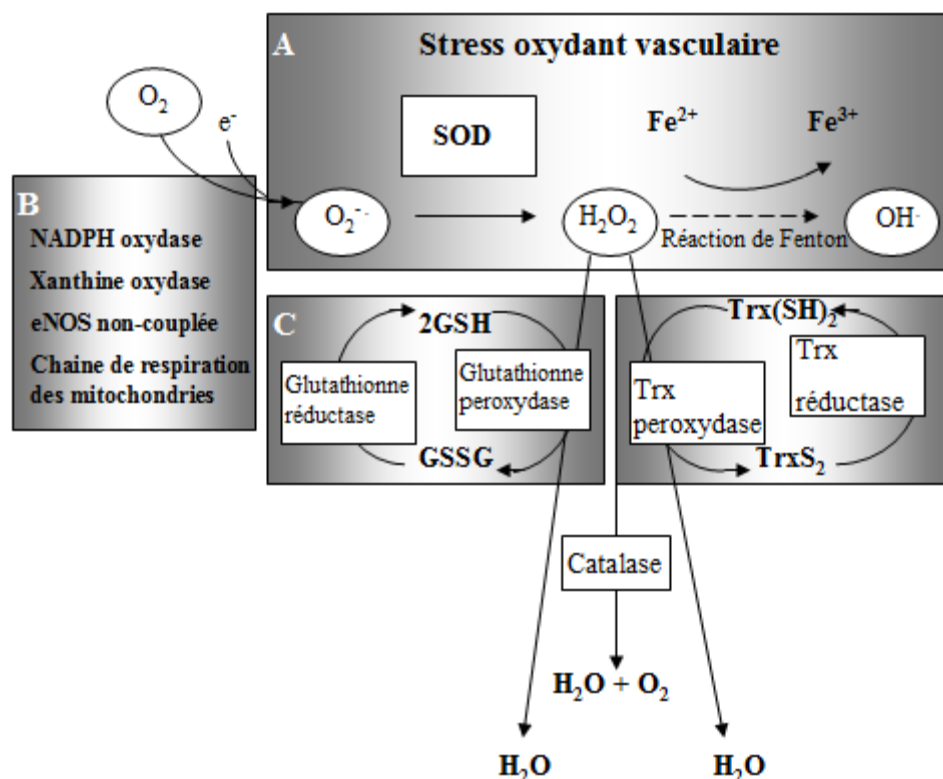


Figure 5. Enzymes impliquées dans l'activation et l'inactivation des ROS.

A) Le stress oxydant résulte de la surproduction de ROS. B) L'oxygène (O_2) réagit avec un électron libre et forme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$). L'implication de la NADPH oxydase, de la xanthine oxydase de la eNOS non-couplée ainsi que de la chaîne de respiration de la mitochondrie a été décrite dans de nombreux papiers(128). L' $O_2^{\cdot -}$ est transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase (SOD). Le H_2O_2 est ensuite transformé spontanément en radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Le radical hydroxyle est très réactif et dommageable en s'attaquant aux cellules. C) Le H_2O_2 peut être neutralisé par les enzymes antioxydantes comme la catalase, la glutathionne peroxydase et la thioredoxine peroxydase qui le transforme en eau (H_2O) et en oxygène(128).

La formation de peroxynitrite a été observée dans les micro-vaisseaux de femmes prééclamptiques, et les colorations de la nitrotyrosine vasculaire et de la eNOS sont supérieures à celles obtenues de grossesses normales, alors que celle de la SOD est inférieure(127). Une peroxydation des lipides circulants est aussi observée chez les femmes souffrant de prééclampsie(129). Le placenta produit des lipides peroxydés, leurs concentrations circulantes sont augmentées lors de la grossesse puis diminuées après l'accouchement(130). Le taux de peroxydation des lipides est anormalement élevé dans les placentas lors de grossesses prééclamptiques(131) et ces lipides peroxydés sont sécrétés dans la circulation maternelle(132).

2.3.5 Inflammation et immunité

La réponse immunitaire innée est diminuée afin de prévenir un rejet du fœtus. La production de cytokines proinflammatoires est alors modifiée. Par conséquent, l'immunité humorale prédomine l'immunité à médiation cellulaire (lymphocyte – T)(133). L'équilibre revient progressivement vers une prévalence de l'immunité à médiation cellulaire en fin de grossesse. Une régulation appropriée de ces processus permet non-seulement une grossesse normale mais aussi un déclenchement adéquat de l'accouchement à terme(133). Toutefois, en prééclampsie, l'inverse se produit et l'équilibre est déplacé vers une prépondérance de l'immunité à médiation cellulaire, soit à une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, soit le TNF- α , les interleukines 1, 2, 6, 12, 15, 18 (IL1, IL2, IL6, IL15, IL18), ainsi que l'interféron gamma (INF- γ)(133).

La grossesse représente un défi immunologique chez la femme. En effet, la formation du placenta ainsi que le fœtus doivent être protégés d'un rejet par le système immunitaire de la mère. Tel qu'expliquer précédemment, la prééclampsie a été associée à une réponse immunologique de la mère au fœtus et plusieurs études ont appuyées cette hypothèse(134). Diverses cytokines proinflammatoires, telles le TNF- α et l'IL1- β ont été rapportées comme étant plus élevées en prééclampsie, alors que d'autres cytokines restent inchangées. Si le placenta a été pointé comme étant l'origine potentielle de la production de cytokines retrouvées en circulation, la confirmation de cette hypothèse doit être étudiée de manière plus approfondie. Toutefois, il est connue que la relâche de facteurs pro-inflammatoires en circulation, peu importe sa provenance, a des effets délétères sur plusieurs mécanismes moléculaires, dont la cascade de coagulation et la relaxation vasculaire, en plus d'induire du stress oxydant(134).

L'hypoxie placentaire a aussi un rôle à jouer dans les phénomènes immunologiques impliqués en prééclampsie. Si HIF est déjà exprimé par le placenta lors de grossesse normal, afin de permettre la formation du celui-ci, il a été observé que l'expression de ce facteur était altérée en prééclampsie. L'expression de HIF1 α joue un rôle important dans la cascade des facteurs impliqués dans l'hypoxie et l'angiogénèse, et le facteur nucléaire kappa activé dans les cellules B (NF- κ B) est un facteur de transcription important de HIF1 α . Il y a donc un croisement entre l'hypoxie et le système immunitaire à ce niveau(133).

Chapitre 3 – L’hypertrophie cardiaque

3.1 L’hypertrophie cardiaque physiologique

L’hypertrophie cardiaque est caractérisée par l’augmentation de la masse et de la taille des cardiomyocytes, permettant ainsi au cœur d’augmenter sa force contractile en réponse à une augmentation de son travail. Cette réponse physiologique peut être bénéfique si elle est induite par un stimulus comme le développement, l’entraînement physique ou la grossesse. La réponse compensatoire du cœur à ces stimuli est adaptative, bénéfique et réversible(135).

Le remodelage cardiaque a une morphologie différente dépendamment du type et/ou de l’intensité du stimulus qui l’a induit (Figure 6). Le premier type de remodelage est excentrique, c'est-à-dire que la taille de la chambre ventriculaire augmente de façon proportionnelle avec l’épaisseur de la paroi. Ce type de remodelage survient en réponse à une surcharge de volume, comme c’est le cas lors de la grossesse ou en réponse à l’entraînement physique(136-138).

L’origine moléculaire des différents types d’hypertrophie cardiaque reste encore à déterminer, par contre, l’expression de gènes distincts a été associée à certains types d’hypertrophies. De plus, l’hypertrophie des cardiomyocytes a pu être induite *in vitro* suite à leur stimulation par étirement(139) ainsi que par divers facteurs

de croissance(140) et neurohormones(141). Les différents types d'hypertrophie cardiaque ont alors été associés à des voies de signalisation intracellulaires distinctes, et donc à divers patrons d'expression de gènes.

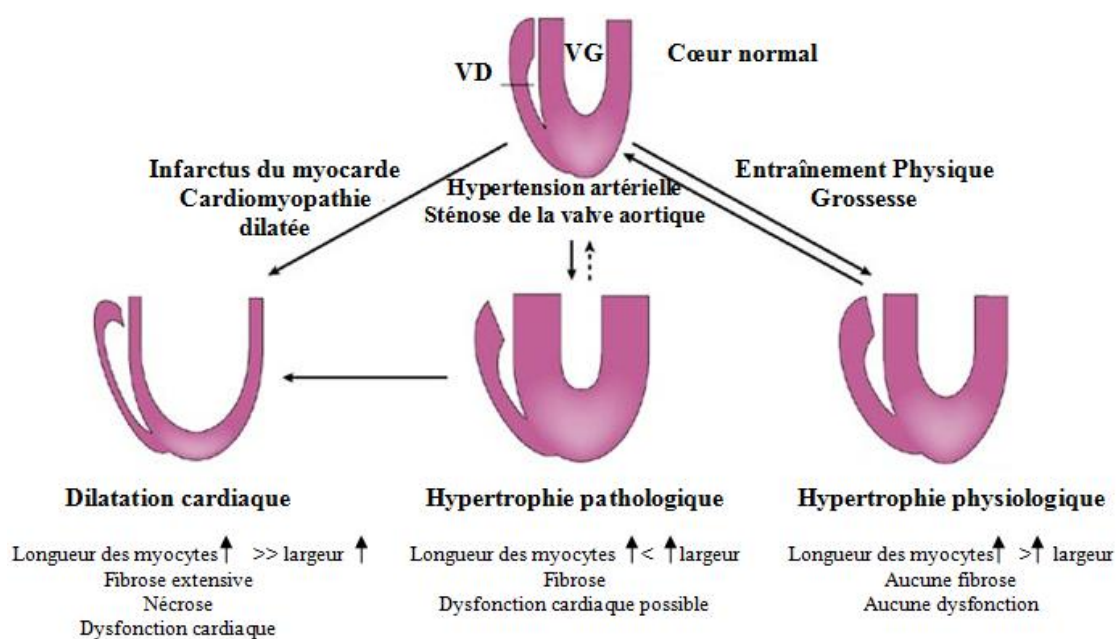


Figure 6. Divers types d'hypertrophie cardiaque.

Différences morphologiques entre les divers types d'hypertrophie cardiaque(142).
VG : ventricule gauche; **VD** : ventricule droit; **DCM**; cardiomyopathie dilatée

Chez la souris, il a été confirmé en analysant les coupes transversales du ventricule gauche en fin de gestation que le remodelage cardiaque dû à la grossesse, avait une morphologie excentrique. Tel qu'observé par échocardiographie ces mêmes cœurs ne démontraient aucune perte de leur fonction(143). Aucune ré-expression des gènes fœtaux n'a pu être notée par PCR en temps réel, ce phénomène étant associé à l'hypertrophie cardiaque pathologique(143). Une diminution des canaux potassiques

de type Kv4.3 ainsi qu'une augmentation de l'activité de la kinase régulée par l'étirement de type c (c-Src) ont été rapportés par cette même étude. Les auteurs proposaient que ces changements soient régulés par les œstrogènes, puisque l'infusion de cette hormone diminuait l'expression autant du gène que de la protéine de Kv4.3. Cette réduction était confirmée chez des souris ayant subi une ovariectomie qui étaient traitées aux œstrogènes, et chez lesquelles l'administration d'un antagoniste du récepteur des œstrogènes renversait ces effets. Aussi, contrairement à l'hypertrophie excentrique pathologique, aucune différence ne pouvait être observée au niveau des marqueurs moléculaires classiques tels les types alpha et bêta de la chaîne lourde de la myosine (MHC- α - β), l'ANP, le phospholamban et l'ATPase du Ca^{2+} sarco/endoplasmique (SERCA)(143). Chez le rat(144) des résultats concordants ont été observés. Une augmentation du GMPc, de la eNOS, de la synthase du monoxyde d'azote inducible (iNOS), des récepteurs aux œstrogènes de type alpha (ER- α) et des récepteurs à l'ocytocine (OTR) ont aussi été notés dans l'oreille droite ainsi que dans le ventricule gauche. Aucune modification n'était observable au niveau des récepteurs aux œstrogènes de type bêta (ER- β) et des peptides natriurétiques et leurs récepteurs. Les voies de signalisation impliquées sont encore peu connues mais des voies potentielles ont été suggérées. En effet, la diminution de l'expression des canaux Kv4.3 pourrait mener à une dépolarisation et une augmentation subséquente de l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule, et par conséquent à une activation des voies de signalisation impliquant le Ca^{2+} . En culture cellulaire, il a été démontré que l'activation du récepteur ER- α activait c-Src et qu'il en découlait une activation de la voie de la kinase du phosphoinositide-3-kinase (PI3-K)(145). L'augmentation de ER- α

dans le cœur de femmes enceintes et l'implication de la voie de la PI3-K dans l'hypertrophie cardiaque physiologique rendent cette voie potentielle très intéressante. c-SRC est donc une cible importante à investiguer, étant donné qu'elle est impliquée dans la signalisation des récepteurs couplés aux protéines-G (GPCRs) et des ER et que son activation influence la voie des kinases activées par les protéines mitogènes (MAPKs) ainsi que celle de la PI3-K. Toutes ces voies sont impliquées à des niveaux différents dans l'hypertrophie cardiaque(138)

Pour ce qui est de l'hypertrophie cardiaque physiologique induite par l'entraînement, aucune augmentation de l'expression cardiaque de l'ET-1 ni de l'AngII n'est noté en réponse à l'entraînement physique. Une étude a démontré chez la souris qu'une surexpression d'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) était associée à l'hypertrophie cardiaque physiologique caractérisée par une amélioration de la fonction systolique(146). Ce facteur de croissance se lie à son récepteur aux tyrosines kinases, IGFR, et active l'isoforme p110 α de la classe 1A de la PI3-K. Suite à cette activation, la PI3-K phosphoryle Akt, qui à son tour ira phosphoryler mTOR, un effecteur des S6Ks, qui régulent la synthèse de protéines(135). La PI3-K est une enzyme de survie cellulaire, qui entre autre promeut la prolifération cellulaire. En contrepartie, les souris qui sous-exprimaient ce gène avaient des cœurs plus petits. Des souris déficientes pour la protéine p85 α ou p85 β ont confirmées le rôle de la classe 1A de la PI3-K dans le développement de l'hypertrophie cardiaque physiologique. En effet, celles-ci avaient une hypertrophie diminuée suite à leur entraînement(147). L'étude de l'isoforme p110 γ de la classe 1B de la PI3-K a montré qu'elle avait un

effet inotropique négatif, qu'elle induisait une diminution de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et augmentait la dégradation de celle-ci, provoquant une hypertrophie cardiaque concentrique(148;149). La voie de signalisation de la PI3-K joue donc un rôle primordial dans le développement de l'hypertrophie cardiaque, cependant ce sont des isoformes différentes de cette enzyme qui sont impliquées selon que l'hypertrophie est induite par un stimulus physiologique ou pathologique.

3.2 L'hypertrophie cardiaque pathologique

Il a été démontré que l'hypertrophie cardiaque pathologique est caractérisée par une accumulation de fibroblastes cardiaques et de protéines de la matrice extracellulaire, causant ainsi de la fibrose et par conséquent une perte de l'élasticité mécanique du cœur. Il en résulte alors une dysfonction diastolique et éventuellement à une dysfonction systolique. L'hypertrophie de type concentrique pathologique est observée en réponse à l'hypertension artérielle (Figure 6), et elle est caractérisée par un rétrécissement du volume de la chambre et une augmentation de l'épaisseur de la paroi ventriculaire(118-120). De plus, les gènes précoces c-jun, c-fos et Egr-1 sont rapidement exprimés en réponse aux stimuli hypertrophiques(135). La réexpression de gènes fœtaux normalement exprimés au cours du développement a été observé, par exemple celui codant pour l'ANP, son homologue le peptide natriurétique du cerveau BNP, la β -MHC, l' α -actin de muscle lisse ainsi que par une diminution de la SERCA2

et de l' α -MHC(150). L'apparition de fibrose ainsi que l'induction des gènes fœtaux n'est cependant pas observé en hypertrophie cardiaque physiologique(135).

Les divers stimuli physiologiques et stress pathologiques vont induire la sécrétion de neurohormones et de facteurs de croissance qui iront à leur tour activer des cascades de signalisation suite à leur liaison à divers récepteurs au niveau de la membrane plasmique des cardiomyocytes. L'hypertrophie cardiaque pathologique a particulièrement été associée à la stimulation de plusieurs GPCRs. En effet, les récepteurs à l'endothéline de type A (ET-A), les récepteurs AT1, ainsi que la stimulation des récepteurs α et β -adrénergiques sont activés et promeuvent la réponse hypertrophique(135). Ces récepteurs sont liés à la protéine $G_{\alpha q}$, qui elle est impliquée dans l'hypertrophie cardiaque. En effet, l'inhibition spécifiques de la signalisation induite par cette classe de protéine prévient ou diminue l'hypertrophie cardiaque en présence de surcharge de pression chez la souris(151;152). Une fois stimulée, elle recrute et active la phospholipase C (PLC) qui activera l' IP_3 (inositol 1,4,5-triphosphate), et ensuite induira l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire via deux voies différentes, soit en augmentant l'entrée de Ca^{2+} en provenance du milieu extracellulaire via la voie diacylglycérol/protéine kinase C (DAG/PKC), ou en augmentant la sortie du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique. Cette augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire activera le complexe Ca^{2+} /Calmoduline, activant ainsi la calcineurine. La calcineurine est une phosphatase qui déphosphorylera ensuite le facteur de transcription nucléaire des cellules-T (NFAT) permettant ainsi sa translocation au noyau, et par conséquent, la transcription de gènes induisant

l'hypertrophie cardiaque(153;154). Il a été démontré qu'une surexpression de la calcineurine et aussi celle de NFAT induisait une hypertrophie cardiaque concentrique dans des modèles de souris transgéniques(155;156). Il a également été observé que la calcineurine était activée lors de l'hypertrophie cardiaque concentrique stimulée par une surcharge de pression(157). La calcineurine peut être inhibée par la protéine inhibitrice de la calcineurine, MCIP, qui se lie à sa sous-unité catalytique, ainsi que par la Cyclosporine A. Il a été démontré que des souris transgéniques déficientes en MCIP développent une hypertrophie cardiaque fatale(158), alors que la surexpression de MCIP prévenait l'hypertrophie *in vitro*(155). La signalisation via les kinases de la calmoduline (CAMK) est aussi impliquée dans l'hypertrophie cardiaque concentrique stimulée par une surcharge de pression. Il a été démontré la surexpression de CAMKIV chez la souris provoquait le développement d'une d'hypertrophie cardiaque de type concentrique, d'une augmentation de l'ANP et d'une diminution de l' α -MHC, accompagnée d'une insuffisance cardiaque(159). La CAMKII est activée suite à une surcharge de pression qui induit une hypertrophie concentrique, pouvant dégénérer en la dilatation du cœur et conséquemment en l'augmentation de la mortalité(160). Suite à la stimulation des GPCRs couplés à G_q mentionnée plus haut, les voies de signalisation des MAPKs sont aussi activées. En effet, quoi qu'il soit certain qu'ERK1/2, p38 et c-Jun soient impliqués dans la signalisation au niveau de l'hypertrophie cardiaque pathologique et physiologique, leur rôle distinct dans ces différents types d'hypertrophie est encore à déterminer(135). TGF- β est une autre molécule qui est impliquée dans l'hypertrophie cardiaque pathologique, et qui par sa signalisation via l'activation des protéines SMADs aurait des effets néfastes, entre

autre en favorisant la fibrose(161). La vasopressine semblerait elle aussi, via son récepteur V1a, avoir des effets pro-hypertrophiques via la voie de la PLC et de l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire(162).

L'hypertension artérielle qui caractérise la prééclampsie cause une surcharge de pression au niveau du cœur. Comme lors de la grossesse normale, une hypertrophie cardiaque est développée. Toutefois, il a été démontré que contrairement à la grossesse normale, l'hypertrophie cardiaque chez les femmes atteintes de prééclampsie était de type concentrique(163). Selon cette même étude, la contractilité ventriculaire serait toutefois conservée, contrairement à l'hypertrophie concentrique pathologique. Par contre, une autre étude de la fonction cardiaque a démontré que les mères souffrant de prééclampsie avaient une performance ventriculaire diminuée, notamment au niveau du débit cardiaque, en comparaison avec les mères contrôles(164). La littérature portant sur la fonction du cœur en prééclampsie est très restreinte et les conclusions quant à la présence de dysfonction cardiaque divergent(165-167). Il est fort probable que la sévérité de la maladie chez chaque femme ainsi que la présence ou l'absence de différents facteurs de risques chez celles-ci soient à l'origine de ces distinctions. Les mécanismes moléculaires à l'origine de la prééclampsie sont encore peu connus tout comme ceux initiant l'hypertrophie cardiaque qui y est reliée.

Chapitre 4 - L'entraînement physique

4.1- Bénéfices cardiovasculaires

L'entraînement peut réduire la pression artérielle, améliorer le profil lipidique, la sensibilité à l'insuline ainsi que la vascularisation des muscles squelettiques, en plus de prévenir plusieurs conditions pathologiques telles l'obésité, le diabète de type-II, l'hypertension artérielle et l'hyperlipidémie(168). L'entraînement n'est toutefois pas que protecteur au niveau du système cardiovasculaire. Effectivement, la prévention de certains types de cancers ainsi que l'amélioration de la santé psychologique ajoutée à la diminution du stress comptent parmi les effets bénéfiques d'une telle activité sur la santé(168).

De nombreuses études ont été faites afin de comprendre par quels mécanismes l'entraînement est protecteur. Plusieurs voies potentielles ont été élucidées et le rôle de plusieurs protéines clés a été déterminé. Un des mécanismes probablement impliqué est celui de l'angiogénèse(169). Au niveau du cœur, l'hypertrophie cardiaque physiologique qui est associé à l'entraînement a pour fonction d'augmenter la contractilité et la fonction du ventricule gauche. La formation de nouveaux vaisseaux est alors induite, soit l'artériogénèse et l'angiogénèse, permettant ainsi le maintien de la perfusion coronarienne et par conséquent réduisant le risque d'événements ischémiques au niveau du cœur. L'entraînement améliore aussi la mobilisation des cellules endothéliales progénitrices au niveau de cet organe(169). L'entraînement

physique diminue la pression artérielle et le risque de devenir hypertendu(170), ce qui favorise nécessairement la condition du cœur. En effet, l'hypertension artérielle chronique peut causer une hypertrophie pathologique au niveau du cœur, et même à long terme, de l'insuffisance cardiaque. L'exercice a donc des propriétés cardioprotectrices directes et indirectes.

Il a été démontré que l'entraînement physique améliorait la capacité vasodilatatrice et antioxydante de l'endothélium vasculaire(169). Effectivement, au moment de l'exercice aigu, l'endothélium fait face à une quantité accrue de forces de cisaillement, c'est-à-dire la force mécanique exercée par le flot sanguin sur la paroi vasculaire. Des études *in vitro* ont suggéré que ce phénomène était bénéfique puisqu'il induisait une prolifération des cellules endothéliales(171) en favorisant l'expression de gènes protecteurs, notamment l'expression de la eNOS est augmentée, tout comme celle des enzymes antioxydantes, alors que celle des enzymes pro-oxydantes est diminuée (Figure 7).

Dans le même ordre d'idée, le NO est une molécule clé dans les mécanismes impliqués dans la protection par l'entraînement physique. Grâce à ses propriétés vasodilatatrices, le NO régule positivement le flot sanguin, autant dans les muscles squelettiques que dans le cœur, améliorant ainsi la perfusion et diminuant les risques ischémiques. Aussi, il promeut la recapture du glucose dans les muscles squelettiques et réduit la glycolyse, ce qui a pour effet de préserver les réserves énergétiques des muscles(172). L'entraînement physique procurerait une protection cardiovasculaire en

augmentant la relâche de NO induite par les forces de cisaillements, en augmentant l'expression de l'enzyme eNOS dans les muscles squelettiques chez le rat, et en diminuant l'inactivation du NO par la réduction du stress oxydatif, ce qui accroît par conséquent la biodisponibilité de celui-ci(172).

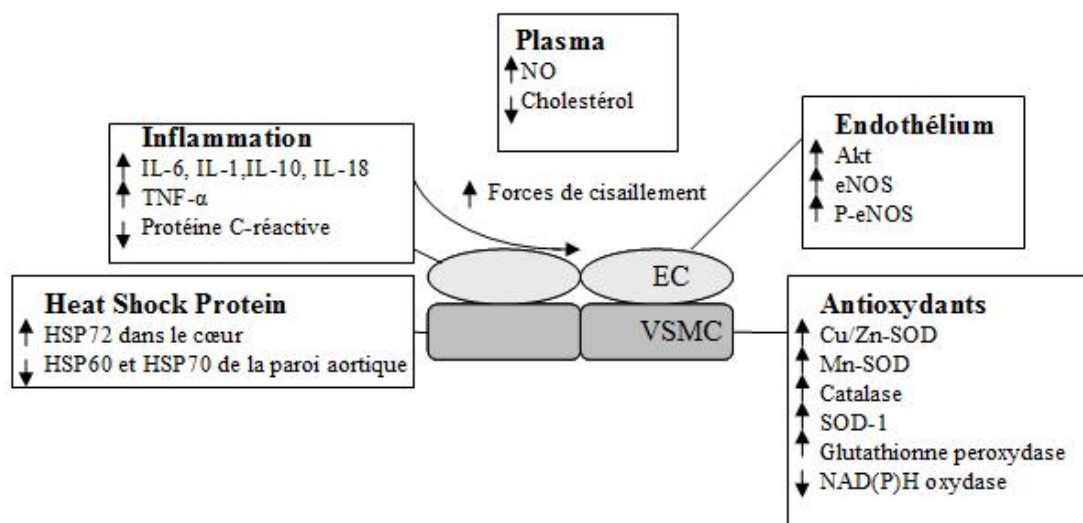


Figure 7. Effets de l'exercice sur l'endothélium et le muscle lisse vasculaire.

L'entraînement affecte plusieurs systèmes impliqués dans la fonction endothéliale et musculaire lisse, soit le système inflammatoire, antioxydant et des *Heat Shock Protein*. (169). EC : cellule endothéliale; VSMC : cellule du muscle lisse vasculaire; IL : interleukine; TNF-α : tumor necrosis factor alpha; HSP : heat shock protein; NO : monoxyde d'azote; p-eNOS : Synthase du monoxyde d'azote endothéliale phosphorylée; SOD : superoxyde dismutase.

La fonction du muscle vasculaire lisse est aussi améliorée par l'entraînement physique. Il a notamment été rapporté dans un modèle animal que la sensibilité au Ca^{2+} était diminuée, tout comme la réponse contractile à l'ET(169). Cette observation

est intéressante puisqu'une réponse accrue à l'ET est impliquée dans plusieurs maladies cardiovasculaires. Toutes ces adaptations de l'endothélium et du muscle lisse vasculaires ont comme résultante de favoriser la réponse aux vasodilatateurs et de réduire la vasoconstriction, ce qui s'avère être un remodelage bénéfique du point de vu des maladies cardiovasculaires.

Il a été démontré que l'exercice aigu induisait du stress oxydant en réponse à l'augmentation des forces de cisaillement ainsi qu'à une inefficacité de la chaîne respiratoire des mitochondries(169). En contrepartie, le système antioxydant est grandement favorisé par l'entraînement physique, ce qui a d'ailleurs été démontré comme étant suffisant pour éviter la peroxydation des lipides(173). L'augmentation des forces de cisaillement augmente l'expression et l'activité de la SOD1, ainsi que de la SOD2 et de la glutathionne peroxydase par les cellules endothéliales(169;174-176).

Il a aussi été suggéré que la protéine HSP70 de la famille des *Heat Shock Proteins* était impliquée dans les mécanismes à l'origine des effets bénéfiques de l'entraînement physique. Ces protéines inductibles en réponse au stress sont ubiquitaires et cytoprotectives. En plus de s'assurer du bon repliement et du transport intracellulaire des protéines, ces chaperonnes assurent l'élimination des protéines non-conformes(177). Il a été rapporté que l'expression de HSP70 était induite suite à l'exercice dans le myocarde(178), dans le muscle squelettique(179;180) ainsi que dans les leucocytes(181) chez l'homme. L'induction de HSP70 est régulée et atténuée par les œstrogènes, conférant ainsi une meilleure cardioprotection chez les rats mâles ainsi

que chez les femelles ayant subi une ovariectomie(182). Le traitement aux œstrogènes abolit l'augmentation de HSP70 par l'entraînement physique, ce qui suggère que la protection induite par ces protéines est plus efficace chez l'homme que chez la femme(169). Les propriétés anti-apoptotiques de HSP70 ont été démontrées(183), suggérant un mécanisme via lequel cette protéine pourrait être protectrice.

Les maladies cardiovasculaires, comme plusieurs autres maladies chroniques, sont caractérisées par la libération systémique de cytokines pro-inflammatoires. Les cytokines peuvent altérer l'endothélium vasculaire directement ou le faire en libérant des radicaux libres(184). L'exercice aigu provoque une réponse inflammatoire à court terme, par contre, à long terme, l'entraînement physique a un effet anti-inflammatoire(185). L'inflammation a été rapportée comme étant inversement proportionnelle à la capacité cardiovasculaire(186). De plus, certaines études ont démontré un effet direct de l'entraînement sur des molécules impliquées dans l'inflammation. En effet, il a été rapporté que les niveaux plasmatiques des transcrits des récepteurs Toll-like-4 (TLR4), qui sont activés par les cytokines inflammatoires stimulées par les lipopolysaccharides, était diminuée suite à l'entraînement physique(187). La même étude démontrait que l'entraînement physique réduit aussi le TNF- α au niveau des muscles squelettiques. Plusieurs évidences démontrent que les canaux K^+ de la membrane du sarcolemme (sarcK_{ATP}) sont impliqués au niveau des mécanismes protecteurs induits par l'entraînement physique (188). Ces canaux sont activés, et par conséquent s'ouvrent suite à une demande métabolique. Ils sont sensibles à l'équilibre entre l'ATP et l'ADP, le premier induisant leur fermeture et le

second leur ouverture(188). Ces canaux ont donc une importance primordiale dans le cœur puisqu'en plus de répondre à un stress énergétique, ils ont une influence sur la durée du potentiel d'action. En effet, leur ouverture résulte en une diminution de la concentration d'ions K^+ dans le cytoplasme, réduisant par conséquent la durée du potentiel d'action. Il a été démontré chez le rat que l'expression cardiaque du canal $sarcK_{ATP}$ était augmentée suite à l'entraînement physique, et que la taille de l'infarctus chez ces animaux était diminuée en plus d'avoir une fonction cardiaque améliorée(189). Tous ces effets bénéfiques étaient abolis par un bloqueur de ces canaux. De plus, ils semblent jouer un rôle clé dans la cardioprotection liée au sexe puisque les femelles et les femmes, qui ont généralement des tailles d'infarctus plus petites que les mâles et les hommes, ont une densité plus élevée de ces canaux qui ont d'ailleurs été démontrés comme étant régulés positivement par les œstrogènes(188). L'activation de ces canaux par l'entraînement physique pourrait protéger via le maintien de l'homéostasie du Ca^{2+} (188). Le mécanisme à l'origine de ce phénomène n'est pas encore très bien compris. Il a toutefois été observé dans plusieurs conditions différentes que l'augmentation de l'expression des canaux $sarcK_{ATP}$ réduisait la surcharge calcique face à un stress métabolique(190), et que leur délétion altérait l'excitabilité de la membrane ainsi que la régulation du Ca^{2+} , et par conséquent, compromettrait l'adaptation du cœur au stress qui lui était imposé(191). Cette implication des canaux $sarcK_{ATP}$ dans l'homéostasie du Ca^{2+} pourrait être un mécanisme via lequel l'entraînement réduirait la pression artérielle, par la réduction de la contraction des VSMC. En effet, dans le même ordre d'idée, les bloqueurs des canaux calciques sont utilisés pour traiter l'hypertension artérielle, l'entraînement

physique aurait donc des effets similaires à ce traitement pharmacologique, entre autre via la réduction de la surcharge calcique via l'augmentation des canaux sarcK_{ATP}.

4.2- L'entraînement et la grossesse

Les lignes directrices de l'*American College of Gynecology and Obstetrics* recommandent aux médecins d'encourager les femmes enceintes en bonne santé à faire 30 minutes d'exercice d'intensité modérée la plupart des jours, sinon à chaque jour de la semaine(192), ce qui correspond aux lignes directrices de l'*American College of Sports and Medicine* pour la population générale(193). Évidemment, les exercices prescrits ne comptent pas les activités sportives qui consistent en un risque de trauma, tel que le ski alpin, le hockey, le soccer, le vélo sur route et l'équitation par exemple(192). La course, le jogging, la danse aérobique, la nage, le ski de fond, le yoga, le pilates, le vélo stationnaire et l'aviron, sont toutes des activités physiques préconisées(192).

Les bienfaits de l'entraînement lors d'une grossesse normale sur le développement du placenta et du fœtus ont été rapportés et caractérisés par diverses études(194;195). Les impacts de plusieurs profils d'entraînement sur la croissance placentaire ont été étudiés. Les placentas des femmes qui commençaient un entraînement modéré au début de leur grossesse avaient un volume total et un volume fonctionnel, c'est-à-dire le volume des villosités, plus élevé que ceux des femmes sédentaires(196;197). Chez des femmes très actives avant d'être enceintes qui

continuaient le même régime d'entraînement pour le premier trimestre de leur grossesse et qui diminuaient ensuite l'espace inter-villeux et l'arborescence des villosités étaient augmentés(198). De plus, chez celles qui s'entraînaient selon un régime d'entraînement modéré à important, avant et tout au long de leur période de grossesse la prolifération cellulaire à terme est augmentée au niveau des trophoblastes, des cellules endothéliales et des cellules stromales(196;199). Ainsi, ceci amène donc une meilleure surface d'échange entre le sang de la mère et celui du fœtus, favorisant ainsi le transfert de nutriments et d'oxygène.

L'entraînement physique pendant la grossesse a donc des effets bénéfiques sur le développement du placenta, et par conséquent, fort probablement sur les échanges fœto-placentaires, sur le transfert de nutriment au fœtus, sur la croissance de ce dernier, et sur sa morphologie à la naissance. Les impacts de l'entraînement physique sur le fœtus lui-même ont aussi été étudiés(194). Les effets sur le poids et la longueur du bébé à la naissance varient selon le type d'entraînement, tout comme le ratio de leur masse maigre par rapport à la masse grasse(194). Certaines études rapportent une augmentation du poids des fœtus et de leur taille(197), alors que d'autres rapportent une diminution du poids. D'autres n'observent aucune différence significative de ces paramètres(194;200). Toutefois, il a été rapporté que les femmes continuant un entraînement tout au long de leur grossesse avaient des bébés de poids égal ou moindre, mais qui avaient un plus grand ratio de leur masse maigre sur leur masse grasse, mais en aucun cas, leur longueur était affectée(201). Ces différences peuvent très bien être expliquées par le type d'entraînement et l'intensité de celui-ci, mais

surtout, par la diète des mères, et donc par l'apport et le type de nutriments que le fœtus reçoit(194). Ainsi, il est possible que certaines femmes qui s'entraînent n'accroissent pas suffisamment leur apport énergétique en fonction de leur entraînement. Il est primordial de ne pas oublier que l'entraînement provoque une dépense d'énergie nécessitant une augmentation de l'apport nutritif afin de subvenir aux besoins de la mère et du fœtus en croissance.

4.3 - L'entraînement et la prééclampsie

Étant donné que l'entraînement physique diminue le risque de développer les maladies cardiovasculaires et en atténue ou en abolit les symptômes, il est raisonnable de croire qu'il pourrait avoir les mêmes effets bénéfiques sur certaines maladies associées à la grossesse, notamment sur la prééclampsie.

Malgré qu'aucune étude clinique de grande envergure n'ait été faite pour étudier si l'entraînement physique pouvait prévenir, retarder l'apparition ou réduire la sévérité de la prééclampsie, des études épidémiologiques suggèrent que le risque de la développer était diminué(202). En effet, dès 1989, suite aux réponses de 931 femmes à un questionnaire qu'elles avaient rempli après leur accouchement, une étude a établi que les femmes qui étaient régulièrement actives au cours des 20 premières semaines de leur grossesse avaient un risque réduit de développer de l'hypertension gestationnelle ainsi que de la prééclampsie(203). Cette étude suggère que le risque relatif diminuait avec l'augmentation du temps d'exercice chez ces femmes. Quelques

années plus tard, une étude faite chez 5605 femmes engagées dans la marine militaire a démontré que celles qui effectuaient un travail nécessitant une activité physique avait un risque réduit de développer de l'hypertension gestationnelle ou de la prééclampsie(204). Plus récemment, un groupe a rapporté que la participation à une activité physique régulière, au cours des 20 premières semaines de grossesse chez 584 femmes, diminuait le risque de développer la prééclampsie de 24%, et que le risque était réduit de 54% chez les femmes qui pratiquaient une activité physique plus vigoureuse, c'est-à-dire dont l'intensité ou la quantité d'énergie dépensée augmentaient(205). De plus, le risque était diminué de 60% chez les femmes qui, en plus de l'activité qu'elles pratiquaient lors de leur grossesse, s'étaient adonnées à un entraînement au cours de l'année précédant cette grossesse. Cette étude rapportait que la quantité de marches montées était inversement proportionnelle au risque de développer la prééclampsie chez les mères dont l'entraînement consistait à grimper des escaliers. La réduction du risque observée s'appliquait autant aux femmes dont c'était la première grossesse qu'à celles qui avaient déjà été enceintes auparavant. Le risque était tout autant diminué chez les femmes obèses ou en surplus de poids que chez les femmes minces. Cependant, les données de l'étude ne dévoilaient pas si la réduction du risque chez les femmes obèses et avec surplus de poids était associée à une perte de poids. Une autre étude a aussi démontré sur un échantillon de 2739 femme que le risque de développer la prééclampsie chez les femmes actives physiquement au cours des 16 premières semaines de leur grossesse était diminué, cependant ce groupe n'a pu observer aucune augmentation du bénéfice en lien avec l'augmentation de l'intensité et de la quantité de cette activité à chaque jour(206).

Toutefois, les données de cette étude ont été recueillies via un rapport d'auto-évaluation de chaque femme enrôlée dans l'étude, ce qui pourrait laisser place à une certaine subjectivité qui ne permettrait pas de quantifier rigoureusement l'activité physique de celles-ci.

Une revue de la littérature publiée dans le *Cochrane Database of Reviews* en 2006 conclut que les données sont encore insuffisantes pour que l'entraînement physique soit recommandé pour prévenir la prééclampsie(207). Deux études cliniques randomisées(208;209) ont été considérées comme étant valides, mais de trop petites tailles et insuffisantes pour fournir des informations quant aux bénéfices de l'entraînement aérobique régulier sur le risque de développer la prééclampsie ainsi que ses complications(207). La première de ces deux études a été faite dans le but de vérifier si l'entraînement diminuait le risque de développer du diabète gestationnel et non la prééclampsie, ce qui explique pourquoi les données sont évidemment insuffisantes quant à la prévention de la prééclampsie. Cependant, les auteurs ont observés que l'entraînement semblait sécuritaire et non délétère chez les femmes à risque(208). Pour ce qui est de la seconde étude, elle était produite pour vérifier si l'entraînement réduisait la pression artérielle chez les femmes à haut risque de développer des désordres hypertensifs lors de la grossesse(209). Cette étude rapporte une diminution presque significative de la pression artérielle diastolique à 10 semaines de grossesse chez les femmes à risque. Il est donc évident que malgré que plusieurs études intéressantes aient démontré une diminution du risque de développer la prééclampsie associée à l'entraînement physique, il est maintenant nécessaire de faire

de grandes études cliniques randomisées pour pouvoir établir une relation de cause à effets entre l'entraînement physique et la prééclampsie. Il est par conséquent très important de faire avancer la recherche fondamentale sur ce sujet, puisque l'accumulation de données et de mécanismes impliqués dans la protection des mères et des fœtus par l'entraînement physique encouragera et justifiera que la recherche clinique s'y intéresse aussi.

Tel que discuté abondamment auparavant, il est suggéré à travers la littérature que la prééclampsie origine fort probablement d'un envahissement et d'un remodelage inadéquat des artères spiralées de l'utérus résultant en une mauvaise irrigation du placenta. Par conséquent, de l'hypoxie et de l'ischémie sont observées au niveau de cet organe, provoquant la relâche de molécules délétères dans la circulation de la mère et les symptômes maternels qui y sont associés. Puisqu'il a été démontré que l'entraînement physique favorisait le développement et le fonctionnement du placenta(194), les femmes enceintes entraînées pourraient être protégées contre le développement de la prééclampsie ou du moins en avoir des symptômes atténués.

L'entraînement pourrait diminuer la pression artérielle des femmes ayant une grossesse prééclampsique en augmentant l'activité des NOS et par conséquent l'expression du NO. La diminution de la contraction des VSMC pourrait avoir lieu via l'inhibition de la voie de la PKC étant donné que le NO et son second messager le GMPc inhibent cette enzyme impliquée dans l'amplification de la réponse cellulaire au Ca^{2+} (210). D'autres voies de signalisations ont aussi un rôle à jouer dans la

contraction via l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, notamment la voie MAPK. Les taux d'ET sont aussi augmentés lors de la prééclampsie, favorisant ainsi la vasoconstriction systémique observée. Comme mentionné ci-haut, l'entraînement diminue la vasoconstriction induite par l'ET et donc pourrait aussi réduire la pression artérielle via ce mécanisme. L'entraînement pourrait donc réduire la pression artérielle et atténuer la vasoconstriction chronique en réduisant la dysfonction endothéliale caractéristique de la prééclampsie.

L'entraînement physique pourrait aussi être bénéfique par rapport à la prévention de la prééclampsie en réduisant le stress oxydatif et subséquemment la dysfonction endothéliale en activant les mécanismes mentionnés précédemment, soit en augmentant les différentes enzymes antioxydantes ou par l'activation de HSP70. En effet, il a été démontré que l'expression des transcrits des récepteurs Toll-like-4 (TLR4) était diminuée suite à l'entraînement. Ces récepteurs sont activés par les cytokines inflammatoires stimulées par les lipopolysaccharides (LPS)(187). Aussi, l'entraînement physique réduit le $\text{TNF-}\alpha$ au niveau des muscles squelettiques(187). Le $\text{TNF-}\alpha$ et l'IL-6, qui elle-même est activée par le $\text{TNF-}\alpha$, sont augmentés chez les femmes prééclamptiques, et il a été démontré que le $\text{TNF-}\alpha$ pouvait causer une dysfonction endothéliale en réduisant la vasodilatation induite par l'acétylcholine et en favorisant la production d'ET(210).

Il est à noter que des adaptations moléculaires dans le cœur et le foie suite à l'entraînement physique seraient régulées, entre autres, par les œstrogènes(211). En

effet, il a été démontré que l'entraînement induisait une adaptation dans l'expression des transcrits des ER dans le foie et le cœur, et que ces effets étaient renversés chez les rats ayant subi une ovariectomie. De plus, en collaboration, la même équipe a aussi démontré tout récemment une augmentation cardiaque de l'expression des peptides natriurétiques, de l'iNOS et eNOS, de l'OTR chez la rate suite à un entraînement physique (144). Ces effets bénéfiques de l'entraînement étaient observés autant chez les rates normales que chez celles qui avaient subi une ovariectomie.

Les mécanismes à l'origine de cette protection potentielle de l'entraînement physique doivent être étudiés et leur élucidation doit en partie passer par l'étude de modèles animaux étant donné les limites rencontrées lorsqu'il s'agit d'étude chez la femme. L'entraînement physique est une avenue plus qu'intéressante à étudier en vue de protéger les femmes souffrant de prééclampsie. Si cette maladie est multifactorielle, l'entraînement est un moyen de la traiter qui l'est tout autant. En effet, les effets bénéfiques de l'entraînement passent par divers mécanismes qui sont impliqués dans le développement de la prééclampsie. De plus, l'absence d'effets délétères sur le fœtus est en faveur de ce type d'approche en comparaison avec la plupart des traitements pharmacologiques qui s'avèrent être tératogènes. Comme pour la grande majorité des maladies chroniques et des maladies cardiovasculaires, l'entraînement physique est probablement la forme de prévention et de thérapie idéale pour prévenir les maladies associées à la grossesse, notamment la prééclampsie.

Chapitre 5 – Modèles animaux de prééclampsie

5.1 - Les rongeurs

L'utilisation de modèles animaux en recherche est centrale et primordiale à l'élucidation des causes et des conséquences de la plupart des conditions pathologiques. Ils permettent une étude extensive et invasive de plusieurs mécanismes physiologiques et pathologiques qui ne pourrait être élaborée de façon aussi détaillée chez l'humain. Les modèles animaux offrent également une meilleure compréhension des faits réels que la culture cellulaire puisque qu'ils reconstituent le tableau complet des réponses systémiques suscitées par un événement précis.

Malgré de nombreuses distinctions morphologiques, les souris et les rats sont, dans un contexte évolutif, rapprochés des primates. En effet, d'un point de vue phylogénétique, les rongeurs appartiennent à un groupe sœur de celui des primates, qui font tous deux partie du même superordre(212). En contrepartie, plusieurs différences majeures entre les humains et les rongeurs font que ces animaux peuvent être tout aussi inappropriés pour étudier certains mécanismes physiologiques pour lesquels ils ne représentent pas la réalité humaine.

Le besoin criant de modèles animaux de la grossesse et de la placentation chez l'humain a incité de nombreux groupes de recherche à étudier plusieurs espèces. La souris a notamment été largement étudiée et les similarités et les distinctions de sa

gestation avec celle de l'humain sont aujourd'hui bien caractérisées(212). Les souris, tout comme l'humain, ont une placentation de type hémochorial. Cet aspect de leur physiologie n'étant pas partagé par la majorité des espèces, leur utilisation est d'autant plus justifiée. La modification des paramètres hémodynamiques lors de la gestation chez la souris s'apparente à celle qu'on observe chez l'humain(213). En effet, la souris gestante a un hématocrite diminué, une réponse à l'AngII réduite, une pression artérielle plus basse en début de gestation ainsi qu'une fréquence et un débit cardiaque accrue(213). Tout comme chez l'humain, l'implantation se fait via l'invasion de la paroi utérine par l'embryon ce qui induit une réponse déciduale(56). Cette étape se produit à 7 jours post-fertilisation chez la femme alors qu'elle a lieu à 4.5 jours de gestation chez la souris(56). L'aire où a lieu les échanges entre la souris et son fœtus s'appelle le labyrinthe et similairement à chez l'humain, elle est constituée d'une arborescence de villosités recouvertes de trophoblastes et de syncytiotrophoblastes(56). La vascularisation du labyrinthe se fait à 10 jours de gestation chez les souris, en comparaison à 25 jours chez la femme(56). Les cellules trophoblastiques géantes chez la souris sont analogues aux cytotrophoblastes extravilleux du placenta humain qui forment la couche la plus à l'extérieure des villosités. Pareillement à la femme, les souris expriment des trophoblastes spécialisés qui envahissent les artères spiralées de l'utérus pour les remodeler, et leur fonction tout comme les gènes qu'ils expriment sont similaires à ceux des trophoblastes endovasculaires humains(56).

Il est toutefois important de garder certaines considérations en tête lorsqu'il s'agit d'utiliser les souris comme modèle animal de la grossesse humaine. En effet, certaines différences importantes doivent être prises en compte afin de pouvoir faire une analyse éclairée des résultats obtenus de ce modèle. Le placenta des souris n'est vascularisé qu'au jour 10, soit à la moitié de leur gestation de 21 jours contrairement à chez la femme où il l'est vers 25 jours, soit au dixième de la grossesse(56). Pour l'étude de la prééclampsie, étant donné que les souris ont des portées de plusieurs souriceaux, et que chacun possède son propre placenta, il est possible que l'impact des facteurs relâchés dans la circulation maternelle par ceux-ci soit différent de chez la femme. En fait, il est important de tenir compte du nombre de placenta, puisque cela diffère d'une portée à l'autre, ainsi que du nombre de placenta ou de fœtus affectés par une condition pathologique, afin de pouvoir comparer les souris entre-elles.

Quelques modèles animaux de la prééclampsie ont été caractérisés et ont grandement contribué à la compréhension de certains mécanismes impliqués dans le développement de la maladie. Toutefois le travail à faire en vue de comprendre, de prévenir et de traiter cette maladie est encore considérable. D'où l'importance de continuer la recherche en ce sens ainsi que la recherche de modèles animaux représentatifs de la réalité clinique.

5.2 Les modèles animaux de la prééclampsie

5.2.1 Les souris de la lignée BPH/5

Les souris de la lignée BPH/5 sont dérivées de l'accouplement consanguin de souris de la lignée BPH/2 qui elles sont génétiquement spontanément hypertendues. Lorsqu'elles sont gestantes, ces souris normotendues développent spontanément les symptômes de la prééclampsie(214). Davisson et ses collaborateurs ont démontré que la pression artérielle moyenne de ces souris augmentait au dessus de 150 mmHg au cours du dernier tiers de la gestation, en plus d'être accompagné d'une protéinurie ainsi que d'une glomérulosclérose confirmant l'atteinte des reins(214). Elles exhibent une dysfonction endothéliale en fin de gestation, qui est définie par une réponse accrue à l'AngII(214). Ces souris accouchent de petites portées, malgré un nombre normal de fœtus en début de gestation, démontrant une mortalité fœtale en cours de grossesse, et leurs souriceaux sont plus petits(214). Le poids restreint des fœtus ainsi que de leur placenta suggère que ce modèle en est un de prééclampsie accompagnée d'IUGR(215). L'étude de la condition pathologique des placentas des souris BPH/5 a démontré que l'invasion déciduale était faible. De plus, l'expression du gène $p57^{kip2}$, qui inhibe plusieurs cyclines et kinases dépendantes des cyclines (CDK) et qui est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire des trophoblastes, par les trophoblastes régulant l'invasion interstitielle ainsi que par les cellules trophoblastiques géantes des souris BPH/5, étaient diminuée par rapport aux souris normales(215). Aussi, le labyrinthe de ces placentas présente plusieurs défauts anatomiques. Entre autres, la circulation utéro-placentaire est compromise et les vaisseaux traversant la décidua, qui

sont normalement dépourvus de muscle lisse et dont l'endothélium a été remplacé par des trophoblastes, montrent un épaississement accompagné d'un rétrécissement de leur lumière, ainsi qu'une présence persistante de muscle lisse(215). Le flot sanguin mesuré par échographie Doppler était diminué dans les artères utérines de ces souris, et par conséquent la perfusion du placenta était inadéquate. Une étude plus récente a démontré que les placentas des souris BPH/5 avaient des taux de ROS accrus ainsi qu'une expression et une activité antioxydante réduite(216). Ces observations ont été faites avant que les symptômes maternels n'apparaissent chez ces souris, suggérant un mécanisme potentiel impliquant les RO placentaires dans le développement de la condition pathologique fœtale et maternelle. Le traitement chronique des mères avec du Tempol, un analogue de la SOD, améliore la survie et le développement de leurs fœtus en plus de diminuer leur pression artérielle ainsi que leur protéinurie(216).

Ce modèle animal de la prééclampsie est très intéressant pour étudier la cinétique spatio-temporelle de la maladie ainsi que les mécanismes impliqués dans son développement et donc dans son traitement potentiel.

5.2.2 Les souris hANG x hRN

Des altérations au niveau de l'expression et de l'activité des composantes de RAS sont suspectées comme étant des causes potentielles du développement de la prééclampsie(15). Basée sur le fait que la région utéro-placentaire possède son propre RAS, il a été rapporté que des femelles transgéniques surexprimant l'Agt humaine

(hANG) développent des symptômes de la prééclampsie lorsqu'elles sont accouplées à des mâles transgéniques surexprimant la rénine humaine (hRN)(217). Les souris hANG développent une hypertension (156.4 ± 3.73 mm Hg systolique) ainsi qu'une protéinurie en fin de gestation qui se résorbent après l'accouchement. Les glomérules des reins de ces souris sont élargis alors que leur cœur présente une hypertrophie pathologique concentrique, et que leurs placentas montrent des signes de nécrose et d'œdème(217). Le clivage de l'Agt par la rénine est espèce-spécifique, ce qui explique que les femelles soient normotendues avant la gestation. Les symptômes qu'elles développent au cours de leur gestation sont dus au fait que les concentrations plasmatiques de rénine humaine provenant des placentas sont drastiquement élevées en fin de gestation et ainsi contribuent à l'augmentation de l'AngII dans ce modèle. D'ailleurs, l'importance des récepteurs AT1 dans le développement des symptômes fœtaux et maternels dans ce modèle a été démontrée par le même groupe(218). Aussi, la néovascularisation du placenta de ces souris est inadéquate et leurs concentrations de sFlt-1 plasmatiques sont augmentées, contrairement à l'expression de leurs métalloprotéinases placentaires qui sont diminuées(219).

Toutefois il est important de noter que les mêmes observations phénotypiques ne sont pas observées si une femelle surexprimant la rénine humaine est accouplée avec un mâle surexprimant l'Agt humaine(220). Lorsque c'est la femelle hANG qui est accouplée avec un mâle hRN, les cellules trophoblastiques géantes du placenta expriment la hRN et cette-dernière est relâchée dans la circulation maternelle. En contrepartie, lorsqu'une femelle hRN est accouplée avec un mâle hANG, elle exprime

l'Agt humaine dans ses trophoblastes chorioniques et épithéliaux, alors, l'hANG est indétectable au niveau du plasma de la mère(220). Les auteurs ont suggéré que ce phénomène devait être dû à une expression spatio-temporelle distincte des deux gènes. Ces résultats suggèrent que les symptômes fœtaux (IUGR) et maternels (prééclampsie) sont dus à une surexpression de la hRN ainsi qu'à sa perméabilité vers la circulation maternelle plutôt que via une surexpression fœto-placentaire de hANG(220).

Le traitement de ces souris avec un bloqueur des récepteurs AT1 réduit leur pression artérielle ainsi que l'hypertrophie cardiaque pathologique qui les caractérise(221). Le bloqueur des récepteurs AT1 provoque une diminution de la présence de fibrose et d'apoptose dans les cœurs de ces souris, en plus de réduire les concentrations plasmatiques de certains marqueurs de l'insulte cardiaque, soit la créatinine kinase (CK) et son isoenzyme la créatinine kinase MB (CKMB)(221). Cette étude démontre l'importance de l'implication de l'activation des récepteurs AT1 dans le remodelage cardiaque pathologique associé à ce modèle.

Le modèle de souris hANG est un bon modèle pour étudier la prééclampsie puisque les femelles n'ont aucun symptôme avant leur gestation et elles développent la maladie au cours de leur grossesse. De façon similaire à certaines femmes qui développent la prééclampsie, elles ont une prédisposition génétique qui peut être considérée comme étant un facteur de risque. De plus, l'implication du RAS dans la prééclampsie a souvent été suggérée étant donné que des altérations au niveau de ce système ont été associées à la maladie.

5.2.3 Les souris catéchol-o-méthyltransférase

Les femmes souffrant de prééclampsie ont des niveaux restreints de catéchol-o-méthyltransférase (COMT) et de 2-ME et sont plus sujettes à l'IUGR(222;223). La carence en COMT résulte en une absence de la 2-méthoxyœstradiol (2-ME), un métabolite de l'œstradiol qui est normalement élevé en circulation au troisième trimestre de la grossesse chez la femme. De cette observation, un nouveau modèle de souris transgéniques a été caractérisé(224). Les souris déficientes en COMT accouchent prématurément ont plus d'embryons morts avant terme que les souris normales. De plus, les souris *comt*^(-/-) ont des placentas de moindre masse ainsi qu'un ratio embryon/placenta plus élevé que les souris normales. La pression artérielle des souris *comt*^(-/-) augmente en fin de gestation et revient à la normal dans les 10 jours suivant l'accouchement. Ces souris développent aussi de la protéinurie et des altérations rénales caractérisées par un détachement, une vacuolisation ainsi qu'une enflure des cellules glomérulaires endothéliales. Elles présentent donc les symptômes de prééclampsie. Les placentas des souris *comt*^(-/-) présentent une accumulation du facteur d'hypoxie HIF-1 α ainsi qu'une invasion trophoblastique superficielle des artères spiralées de l'utérus. La plupart des cellules hypoxiques se retrouvent au niveau de la couche de spongiotrophoblastes, c'est-à-dire entre les cellules trophoblastiques géantes et les cellules du labyrinthe. Ces souris ont aussi des concentrations plasmatiques accrues de sFlt-1, ainsi qu'une expression réduite d'eNOS placentaire. Tous les symptômes de prééclampsie observés chez les souris *comt*^(-/-) sont normalisés par l'administration de 2-ME chez celles-ci(224).

Aussi, la pression artérielle de ces souris lors de la grossesse est significativement plus élevée que celle des souris gestantes normales et des souris non-gestantes, toutefois, cet accroissement, bien qu'il soit significatif demeure peu élevé. En effet, la valeur la plus élevée de leur pression à 17 jours n'atteint même pas 130 mm de Hg systolique.

Ces souris représentent un modèle intéressant de la prééclampsie et permettront certainement d'étudier plusieurs mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de cette maladie.

5.2.4 Les souris p57kip2^(-/+)

En 2002, Kanayama et ses collaborateurs ont caractérisé un nouveau modèle de souris développant des symptômes de prééclampsie(225). La protéine p57kip2 inhibe plusieurs cyclines et kinases dépendantes des cyclines (CDK), qui régulent le cycle cellulaire des trophoblastes. Le gène p57kip2 est un gène qui doit être imprimé par le père (*paternally imprinted*), et les souris déficientes hétérozygotes p57kip2^(-/+) développent une condition pathologique importante au niveau de leurs placentas ainsi que certaines conséquences fœtales. En effet, une faible quantité de cellules trophoblastiques géantes sont observées à proximité des vaisseaux maternels, une hyperplasie des trophoblastes induit une restriction de l'espace intervilloux. De plus, le groupe a observé une augmentation significative de la pression artérielle de ces souris

au cours de la grossesse, à environ 140 mm Hg systolique, ainsi que l'apparition de protéinurie en fin de gestation(225). Ils ont aussi notés que ces souris souffraient de thrombocytopénie, et que leur expression d'ET était accrue(225). Notre laboratoire a récemment rapporté des données contradictoires concernant ce modèle(53), qui sont d'ailleurs corroborées par un autre groupe qui n'a pu observer aucune hausse de pression artérielle, ni de protéinurie(226). Ces résultats sont exposés dans le premier article scientifique qui compose le corps de cette thèse et l'interprétation de ces résultats en lien avec le sujet de la thèse sera détaillée au cours de la discussion au chapitre 12.

Malgré que le modèle de souris p57kip2^(-/+) n'en soit pas un de prééclampsie, il n'en demeure pas moins qu'il est un modèle très intéressant pour étudier les altérations placentaires(53;225;227;228).

5.2.5 Le modèle RUPP

Le modèle expérimental d'induction d'ischémie utéro-placentaire chronique chez la rate gestante via une réduction de la pression de perfusion (RUPP) est considéré comme étant un bon modèle animal pour étudier certains mécanismes impliqués dans le développement de la prééclampsie(229;230). Ce modèle s'est avéré être un outil important dans la compréhension de plusieurs mécanismes liés à l'induction de la prééclampsie en lien avec une perfusion inadéquate du placenta (210;231). Le modèle RUPP consiste en une réduction du flot sanguin provenant de

l'aorte abdominale ainsi que des deux branches utérines des artères ovariennes au cours de la gestation. Le flot sanguin rénal de ces rates est diminué tout comme leur filtration glomérulaire, leur pression artérielle est significativement augmentée et elles présentent de la protéinurie. La fonction endothéliale de ces rates est compromise et leurs progénitures souffrent d'IUGR(210;230;231).

Il a été démontré que ces rates avaient une réactivité vasculaire accrue ainsi qu'une relaxation dépendante de l'endothélium inadéquate(67). Les diminutions d'expression ou de disponibilité du NO, de PGI₂ ainsi que de l'EDHF ont toutes été suggérées comme étant des causes potentielles de cette altération de la relaxation dépendante de l'endothélium dans le modèle RUPP(210). Pour ce qui est des vasoconstricteurs, il a été observé que l'expression de la pré-pro-endothéline dans la médulla et le cortex rénal des rates RUPP était plus élevée que chez les rates normales(232). La même étude démontre que le traitement de ces rates avec un bloqueur des récepteurs ET-A diminue significativement l'élévation de pression artérielle normalement induite. Une réponse indépendante de l'endothélium a aussi été suggérée comme étant à l'origine de l'augmentation de la réactivité vasculaire dans le modèle RUPP, puisque la contraction en réponse à la phényléphrine était plus forte chez ces rates même en absence d'endothélium vasculaire(210).

Il est important de comprendre que ce modèle possède plusieurs avantages et que son utilisation est justifiée. Un avantage considérable de ce modèle réside dans le fait que les rats ont de plus gros organes que les souris, ce qui permet une plus grande

latitude au niveau de la quantité de mesures qui peuvent être prises, ce qui s'applique aussi aux quantités d'urine et de plasma disponibles. Cependant, la limitation majeure réside dans le fait qu'il ne permet pas de prendre en compte les événements qui précèderaient une perfusion inadéquate chez la femme prééclampsique.

5.2.6 Modèles utilisés

Dans le but d'étudier les mécanismes moléculaires à l'origine de la prééclampsie, nous avons choisi de travailler avec les souris $p57kip2^{(-/+)}$. Cependant, ce modèle s'est avéré inapproprié pour ce type d'étude puisque les souris gestantes ne développaient pas les symptômes de la prééclampsie dans notre laboratoire. Ces souris représentent cependant un bon modèle pour étudier les impacts de l'environnement maternel, du stress et de la diète sur le déclenchement de la maladie, ainsi que pour étudier les altérations au niveau du placenta.

De plus, nous avons décidé de travailler avec les souris hANG accouplées à des mâles hRN pour étudier les impacts de l'entraînement physique sur le développement de la prééclampsie. En effet, ce modèle nous a permis de vérifier si l'entraînement physique pouvait réduire les symptômes de la maladie chez des souris n'ayant aucun symptôme à prime abords, mais ayant toutefois une prédisposition génétique à développer la maladie.

Aucun modèle de prééclampsie superposée à de l'hypertension chronique (SPE) n'avait encore été caractérisé. Une étude avait préalablement été faite chez les rates spontanément hypertendues, cependant, leur pression artérielle diminuait lors de la gestation, tout comme les rates normotendues(233). Nous avons alors vérifié si des souris transgéniques préalablement hypertendues, les souris $R^{+}A^{+}$, développeraient la prééclampsie lors de leur gestation.

Chapitre 6 - Hypothèses

Nous posons l'hypothèse selon laquelle, la diète, le stress et l'entraînement physique ont un impact décisif sur le développement des symptômes de la prééclampsie dans des modèles murins transgéniques de la maladie. Nos objectifs principaux sont d'étudier les mécanismes impliqués dans le développement de la prééclampsie dans différents modèles murins et de caractériser un nouveau modèle de la maladie basé sur un facteur de risque associé à celle-ci.

Nous avons tout d'abord utilisé le modèle de souris déficientes en p57kip2 qui ne développaient pas les symptômes maternels de la maladie dans notre laboratoire. Puisque les animaux avaient été fournis par le groupe même qui les avait caractérisées, nous avons posé notre première hypothèse selon laquelle des facteurs environnementaux, soit la diète et le stress, avaient une importance majeure quant au déclenchement de la maladie dans ce modèle, et ce, même si celle-ci est induite par un défaut génétique.

En lien avec la littérature rapportant que l'hypertension chronique est un facteur de risque important de développer la prééclampsie, et toujours dans le but d'élucider les mécanismes associés à cette maladie, nous avons voulu vérifier si des souris initialement hypertendues pouvaient être un bon modèle animal représentant cette réalité clinique. Nous avons alors établi notre seconde hypothèse, selon laquelle

des souris doubles transgéniques R^+A^+ , qui surexpriment la rénine et l'angiotensinogène humaine et qui sont hypertendues, développeraient les symptômes de la preeclampsie lors de leur gestation.

La prééclampsie est une condition pathologique qui partage plusieurs facteurs de risque avec les autres maladies cardiovasculaires. Il est maintenant bien connu que l'entraînement physique régulier est l'un des meilleurs outils pour prévenir et guérir ce type de maladies. L'entraînement physique est recommandé lors de la grossesse normale, et a des effets protecteurs sur plusieurs organes touchés par la prééclampsie, notamment l'endothélium, le muscle vasculaire lisse, le cœur, en plus de favoriser le développement du placenta ainsi que celui du fœtus. Nous avons alors posé l'hypothèse selon laquelle l'entraînement volontaire et régulier normaliserait, ou atténuerait, les symptômes de prééclampsie dans un modèle de souris transgéniques de la maladie.

Chapitre 7 – Approche méthodologique

Les détails spécifiques à chaque papier pour ce qui est de certaines concentrations, et des anticorps et des amorces utilisées sont décrits dans chacun des papiers à la section ‘‘Matériels et méthodes’’.

Souris. Les souris p57kip2 ont été obtenues du Dr. Keiichi I. Nakayama de l’Université Kyushu à Fukuoka au Japon, alors que les souris doubles transgéniques R^+A^+ ont été produites suite à l’accouplement de souris hétérozygotes exprimant la rénine humaine (lignée Ren9)(234) avec des souris hétérozygotes exprimant l’angiotensinogène humaine (lignée 204/1)(235). Nous avons obtenu ces deux lignées du laboratoire du Dr Curt Sigmund de l’Université d’Iowa aux États-Unis. Pour le modèle de femelles hANG accouplées avec des mâles hRN, les souris hANG sont les mêmes que celles utilisées pour le modèle R^+A^+ , alors que les mâles hRN (lignée hRN8-12) ont été obtenues de Riken BRC (Tsukuba, Japon) avec l’autorisation du Dr. A. Fukamizu(236). Toutes ces lignées transgéniques ont été maintenues dans notre animalerie en les accouplant avec des souris C57BL/6 (Charles River, St-Constant, QC, Canada). Afin de génotyper les souris pour le maintien de la lignée, leur ADN génomique a été purifié à partir des biopsies de queue et ensuite analysé par PCR(234;235). Un cycle de lumière/noirceur aux 12h prévalait dans l’animalerie où étaient gardées les souris. Celles-ci avaient accès à de l’eau ainsi qu’à une diète standard (2018; Teklab Premier Laboratory Diets, Madison, WI, États-Unis) en tout

temps. Toutes les souris utilisées pour nos expériences étaient âgées de 12 à 15 semaines et ont été traitées conformément aux standards mis de l'avant par le conseil canadien de protection des animaux. Toutes les procédures ont été approuvées par le comité institutionnel de protection des animaux du CRCHUM.

Entraînement physique. Les souris ont été placées en cage d'exercice, où elles avaient accès à une roue pour courir sur une base volontaire, 1 mois avant le début de la gestation, et elles y sont restées tout au long de leur grossesse. Chaque cage était reliée à un ordinateur doté d'un programme comptant les tours engendrés par la course des souris (Compte-tour5, Aquila, Boucherville, Qc, Canada), ce qui a permis de quantifier l'entraînement physique de chacune. Les données découlant de la course des souris ont été compilées et analysées.

Télémétrie. La pression artérielle ainsi que la fréquence cardiaque ont été mesurées directement par télémétrie en utilisant un implant TA11PA-C10 (Data Sciences International, St. Paul, MN, États-Unis)(237). Le cathéter de l'implant a été insérée dans l'artère carotidienne gauche chez les femelles anesthésiées à l'isoflurane(53;64), et des mesures ont été enregistrées pendant 3 jours consécutifs, suite à 10 jours de rétablissement suivant la chirurgie. On insère ensuite le mâle dans la cage pour l'accouplement et la gestation a été confirmée par la présence d'un bouchon vaginal, ce qui a été considéré comme le jour 1 de la grossesse. À partir de ce jour, les mesures de pression artérielle et de fréquence cardiaque sont enregistrées à tous les 2 jours, pour une période de 24h, et ce jusqu'au jour 19 de la gestation à partir

duquel les mesures sont prises en continue. Vingt-quatre heures après l'accouchement, des mesures sont prises pour 48h. Afin de mesurer l'impact d'un stress d'immobilisation sur les souris, leur pression artérielle ainsi que leur fréquence cardiaque a été mesuré en continue 1h avant et tout au long des 30mins où l'animal était restreint dans un appareil d'immobilisation (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, États-Unis). Cette procédure était faite avant la gestation ainsi qu'au jour 18 de la gestation.

Protéinurie. Des échantillons d'urine ont été collectés chez nos souris avant le début leur accouplement (jour 0) ainsi qu'au jour 18 de gestation. Les souris sont contentionnées et leur urine est directement prélevée dans un tube de 1.5 ml(53;64). Cette méthode crée un stress minime et écourté en comparaison avec celui qui est inutilement engendré lorsque les souris sont placées en cages métabolique pour 24h. En effet, une augmentation significative de la pression artérielle ainsi que de la fréquence cardiaque a été observée chez les souris placées en cages métaboliques(238). Les échantillons d'urine sont ensuite conservés à -80°C. Des kits ELISA *Albuwell* et *Creatinine companion* pour souris (Exocell, Philadelphia, PA, États-Unis) sont ensuite utilisés pour quantifier les concentrations d'albumine et de créatinine dans l'urine, et ce, conformément aux protocoles du manufacturier. Avant leur utilisation, les échantillons d'urine ont été dilués 1 :10 et les mesures ont été prises en duplicata.

Collecte de tissu et histologie. Des souris qui ont été accouplées et traitées de la même façon que celles en télémétrie sont anesthésiées au jour 18 de leur gestation. Leur sang est collecté par ponction cardiaque et transféré sur glace dans un tube de 1,5 ml contenant de l'EDTA. Le plasma est séparé par centrifugation et conservé à -80°C pour analyses futures. Les bébés ainsi que leurs placentas respectifs sont prélevés et pesés. Les queues des bébés sont coupées afin d'être utilisées pour le génotypage. Les bébés, leur queue, le cœur, et un rein sont gelés dans l'azote liquide immédiatement pour ensuite être conservés à -80°C. Les placentas sont coupés en deux pour soit être congelés de la même manière ou bien pour être fixés, tout comme le deuxième rein, dans la paraformaldéhyde 4% pour la nuit. Les tissus sont ensuite lavés 24h dans un tampon phosphate pour finalement être enrobés de paraffine. Afin de caractériser la morphologie des tissus, une coloration à l'hématoxyline phloxine safran (HPS) est appliquée sur les coupes transversales des reins et placentas préalablement obtenues au microtome. Les procédures d'enrobage dans la paraffine, de coupes ainsi que de colorations ont toutes été faites à la plateforme d'histologie de l'Institut de recherche en immunologie et cancérologie de l'Université de Montréal. La caractérisation de la condition pathologique du placenta a été faite selon cinq critères, soient : la nécrose, l'hyalinisation, la microcalcification, la perte de spongiotrophoblastes et la perte de structure en labyrinthe des trophoblastes. Un score de 0 à 3 a été attribué à chaque paramètre et le score total d'altérations placentaires correspond à la somme des scores de chaque paramètre. L'attribution des scores pour chaque paramètre s'est faite de façon aveugle par rapport au génotype et à l'entraînement afin d'éviter les biais.

Études de la réactivité vasculaire. Au cours de la collecte de tissus, l'artère mésentérique est retirée et placée dans une solution froide de Krebs (118.6 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 25.1 mM NaHCO₃, 26 µM EDTA, 0.18% Glucose, 2.5 mM CaCl₂). Un segment de l'artère est isolé et transféré dans une chambre d'artériographie remplie de Krebs oxygéné où elle est montée sur des capillaires de verre(239). L'artère est ensuite perfusée de façon endoluminale et elle est équilibrée pour 45 mins à une pression de 30mmHg. La réactivité vasculaire est ensuite mesurée en produisant une courbe dose-réponse suite à l'administration de différentes drogues, soit la norépinephrine (10^{-9} à 10^{-5} M), l'acetylcholine (10^{-9} à 10^{-4} M), le sodium nitroprusside (SNP) (10^{-9} à 10^{-4} M), ainsi que l'endothelin-1 (10^{-11} à 10^{-8} M). Toutes les drogues étaient administrées de façon extraluminale et une période de 30mins de lavage entre chacune de ces dernières était respectée afin de permettre à l'artère de retrouver son diamètre de base. Pour les études de vasodilatation, l'artère était pré-contractée à 70% de son diamètre de base avec la quantité nécessaire de norépinephrine.

Mesures plasmatiques. L'Ang II plasmatique des souris a été concentrée via l'utilisation du kit d'extraction C18 (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, États-Unis). Ensuite, la concentration en Ang II des échantillons reconstitués a été déterminée par radioimmunoessai en utilisant un kit commercial (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, États-Unis) conformément aux directives du fabricant. Les mesures de sFlt-1 plasmatique ont été faites en utilisant le kit commerciale ELISA-Quantikine (R&D, Minneapolis, MN, États-Unis). Les échantillons de plasmas ont été préalablement dilués 20X avec la solution de dilution du fabricant afin d'obtenir des résultats compris dans la courbe standard fournie.

Échocardiographies. L'étude trans-thoracique échocardiographique a été faite sur chaque souris au début ainsi qu'à la fin de la gestation. Les souris étaient anesthésiées à l'isoflurane et leur cœur a été analysé par biomicroscopie à haute-résolution ultrasonore (Vevo660; Visualsonics, Toronto, ON, Canada) en utilisant une sonde de 35 MHz permettant un tracé en mode-M des variations spatio-temporelles des dimensions du ventricule gauche (VG). Le positionnement des lignes-M a été guidé par l'échocardiographie en mode-B. La vue de l'axe long para-sternal a été utilisée pour prendre les tracés en mode-M à travers les murs postérieurs et antérieurs du VG au niveau du muscle papillaire. Les lignes d'échantillonnages du mode-M étaient positionnées de façon perpendiculaire à l'aorte ascendante à la sortie du VG afin d'enregistrer le diamètre aortique (AoD). La vitesse du flot aortique est mesurée en utilisant le mode *pulse-wave* Doppler. L'encadrement du tracé a été délimité de façon manuelle pour ensuite calculer l'intégrale temps-vitesse aortique (Vti). La masse du VG a été calculée directement par le logiciel de l'appareil. La fraction d'éjection (EF) est estimée en utilisant la formule: $(LVEDV - LVESV) \times 100 / LVEDV$, où LVEDV et LVESV correspondent respectivement aux volumes télé-diastoliques et télé-systoliques du VG. Les volumes systoliques et diastoliques du VG sont déterminés comme étant $7 \times LVD^3 / (2.4 + LVD)$, où le diamètre du VG (LVD). La fraction de raccourcissement (FS) est donnée par $(LVEDD - LVESD) \times 100 / LVEDD$, où le volume diastolique du VG et LVESD est le volume systolique du VG. Le volume d'éjection (SV) est mesuré par $SV = (AoD / 2)^2 \times \pi \times VTI$. Le débit cardiaque correspond à la fréquence cardiaque multipliée par le volume d'éjection.

Immunobuvardage (Western Blot). Les échantillons de protéines ont été extraits à partir de tissus congelés qui ont ensuite été lyophilisés et homogénéisés dans un tampon de lyse contenant : 50mM HEPES pH 7.5, 137mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 2mM Na₃VO₄, 10mM Na pyrophosphate, 10mM fluorure de sodium, 2mM EDTA, 1% NP-40, 10% glycérol, 34mg/mL PMSF ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, Mississauga, ON, Canada). Les homogénats ont subséquemment été centrifugés 10 minutes à 10 000g à 4°C et les surnageants ont été récupérés et dosés selon la méthode de Bradford. Des échantillons contenant 50µg de protéines ont ensuite été préparés et chargés sur un gel de SDS-polyacrylamide 10%. Un courant de 120V constant a été appliqué pour 1h30. Une fois la migration terminée, les protéines séparées dans le gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose sous un voltage constant de 100V pour 1h30 à 4°C. Les sites non-spécifiques ont été bloqués pour 1h à température ambiante avec du lait 5% - TBS-Tween 0.02%. La membrane était ensuite incubée toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du lait 5%-TBS-Tween 0.02%. La membrane est ensuite lavée 3 X 5 minutes et incubée à température ambiante avec l'anticorps secondaire pour 1h. Les bandes sont ensuite révélées en utilisant l'ECL West Pico kit (Pierce, Rockford, IL, États-Unis). Les protéines totales sont subséquemment mesurées en colorant la membrane à l'Amido Black (Sigma, St-Louis, MO, États-Unis). L'expression de la protéine d'intérêt est ensuite normalisée avec la mesure de protéines totales pour chaque bande.

PCR en temps réel. L'ARN total a été extrait de tissus congelés avec du Trizol, conformément aux directives du manufacturiers (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Afin d'enrayer leur contenu en ADN génomique, les échantillons sont traités avec de la 2 U déoxyribonucléase I (DNase I, amplification grade; Invitrogen, Burlington, ON, Canada)/ug ARN. L'ADNc simple brin est synthétisé avec la transcriptase-reverse *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). La réaction de PCR en temps réel a été faite à l'aide du *iCycler IQ Real Time PCR detection System* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, États-Unis), en utilisant la chimie du SYBR®. Pour ce faire, 2 µl d'ADNc est ajouté à 18 µl de mixte de réaction contenant *1X iQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, États-Unis) and 200 nM d'amorces sens et antisens (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). L'amplification de la 18S des mêmes échantillons est utilisée comme standard interne. Chaque échantillon est amplifié et analysé en duplicata. Les niveaux d'ARNm sont exprimés par rapport à la valeur de leur 18S respective.

Immunohistochimie. Les analyses immunohistochimiques ont été faites sur au moins 3 placentas différents provenant de 3 souris différentes de chaque groupe, donc 9 placentas par groupe. Les tissus enrobés dans la paraffine ont été tranchés à 4 µm puis déparaffinés avec du citrisolv (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Les coupes ont ensuite été trempées dans un tampon sodium citrate (10 mM, pH 6.0) bouillant pour 3 min afin de ramener les antigènes. L'immunomarquage a alors été appliqué à l'aide du système *Catalyzed Signal Amplification (CSA)* (Dako, Carpinteria, CA) selon les instructions du manufacturier avec les modifications suivantes. L'activité de la

peroxidase a été neutralisée pour 15 min à température ambiante à l'aide d'une solution de blocage. Les échantillons étaient rincés dans 3 bains pour 3 min dans du TBS-T (0.05 M tris-HCL, 0.3 M NaCl, 0.1% tween, pH 7.6), pour ensuite être incubés avec la solution de blocage *Endogenous avidin and biotin blocking* (Thermo Scientific, Ottawa, ON, Canada) pour 15 minutes à température ambiante. La liaison aux antigènes non-spécifiques a été bloquée en incubant les échantillons pour 30 min à température ambiante dans une solution de blocage. Les coupes ont ensuite été incubées à 4°C pour la nuit avec l'anticorps primaire spécifique dilué dans du TBS avec 1% de BSA aux concentrations suivantes : anti-pan-cytokeratin (1:800; ab9377, Abcam, Cambridge, MA) et anti-Ki67 (1:1600; ab66155, Abcam). Les coupes de tissu ont ensuite été incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à la biotine (1:5000, donkey anti-rabbit; AP182B, Chemicon international, Millipore, Billerica, MA) pour 1 h à température ambiante. L'anticorps secondaire n'a pas été appliqué dans le cas des contrôles négatifs (Figure 8). Les échantillons ont été incubés 15 min avec le complexe streptavidine-biotine, puis avec le réactif d'amplification du signal pour 15 min à température ambiante. Une autre incubation avec la streptavidine-peroxidase de 15 min a été faite. Les échantillons étaient ensuite colorés avec la solution substrat-chromogen pour 4 min, puis contre-colorés avec l'hématoxylin Mayer's (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) bleue dans 0.3% d'eau *ammonia*. Les coupes ont finalement été analysées et photographiées avec un microscope Leitz Diaplan équipé d'une caméra Nikon CoolPix 990 (Nikon Instruments, Melville, NY).

Chapitre 8 – Impact of diet and stress on the development of preeclampsia-like symptoms in p57^{kip2} mice

IMPACT OF DIET AND STRESS ON THE DEVELOPMENT OF
PREECLAMPSIA-LIKE SYMPTOMS IN P57^{KIP2} MICE

Stéphanie Falcao^{1,2}, Crina Solomon^{1,2}, Caroline Monat¹, Julie Bérubé¹, Jolanta Gutkowska^{3,4} and Julie L. Lavoie^{1,4}

¹Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) – Technopôle Angus, Montréal, Québec, Canada. ²Department of Biomedical Sciences, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. ³Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) – Hôtel-Dieu, Montréal, Québec, Canada. ⁴Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Publication: Impact of diet and stress on the development of preeclampsia-like symptoms in p57^{kip2} mice. *American Journal of Physiology Heart Circulation and Physiology*. 2009 Jan; 296(1):H119-26.

Abstract

The cyclin-dependent kinase inhibitor $p57^{kip2}$ regulates the cell cycle of trophoblastic cells. It has been established by a Japanese group that the heterozygous $p57^{kip2}$ knock-out ($p57^{-/+}$) mice are a good model of preeclampsia as they develop hypertension, proteinuria and placental pathology. However, apart from the placental pathology, we could not observe these symptoms in our laboratory. Hence, we investigated the impact of diet and stress on this model. To do so, we compared the effects of the Japanese diet to that of the North American diet used by our animal facility. Furthermore, the impact of stress was determined by placing the mice in a restraining device before and at the end of gestation. Although the Japanese diet did not have any impact on blood pressure or proteinuria, the mice did develop endothelial dysfunction, left ventricular hypertrophy, as well as had increased placental pathology. Also, all mice had smaller litters when fed the Japanese diet. However, stress response of these mice was not increased during gestation, in fact, a decrease was observed in the $p57^{-/+}$ mice suggesting that this was probably not a player in the development of the pathology. Taken together, these results suggest that other environmental factors may have been implicated in the development of preeclampsia-like symptoms in this animal model. Moreover, we demonstrated that placental pathology and genetic factors are not sufficient to trigger preeclampsia-like symptoms in this model, and that the diet might play an important part in the development of this multifactorial disease.

Key words: knock-out mouse, diet, stress, blood pressure, preeclampsia

Introduction

Preeclampsia (PE) is the most important cause of maternal and perinatal morbidity and mortality(1). It is human pregnancy-associated syndrome diagnosed with a new appearance of hypertension and proteinuria(2) which resolve completely after delivery(3), suggesting that feto-placental factors are the main origin of the pathology. Many studies have demonstrated the significant impact of abnormal placentation in the development of PE, although maternal factors have also been found to promote the disease(4). Indeed, even though no PE gene has yet been characterized, a genetic basis for the pathology has been postulated, and familial predisposition has been implicated(1). Still, as in many cardiovascular diseases, environmental and behavioral factors may influence development of the pathology. Many studies and clinical trials have attempted to find nutrients involved in eliciting or in protecting against PE, but without major success(5). Although the data on the effect of maternal stress on the risk of preeclampsia is controversial, many have shown that it may contribute to the development of the disease(6-9). Indeed, stress has been shown to stimulate the sympathetic nervous system which in turn can modulate peripheral vascular resistance(10) as well as the immune system(11;12) during pregnancy and thus, could be implicated in the development of PE.

As we are describing a maternal-fetal phenomenon, many factors may contribute to the pathology, which makes it hard to establish its exact origin. Furthermore, accumulating data indicate that PE is not a homogeneous disease similar to essential hypertension, and, thus, may not always be produced by the same factors.

Hence, the mechanisms underlying the pathology have not yet been elucidated, and to date there are no therapies available. Indeed, presently, the only “treatment” for PE is the induction of delivery, which can of course be problematic if the symptoms become severe early in the third trimester. Consequently, further studies are required to increase our knowledge of this disease.

Because the emergence of PE can not be reliably predicted, and as it needs to be controlled immediately to prevent serious complications, the investigation of this pathology is difficult in women. On the other hand, in mice, environment and genetic background can be easily controlled. Furthermore, their gestation has many common characteristics with human pregnancy(13), which makes mice an interesting model of the disease. For instance, Kanayama’s group reported that breeding mice that are heterozygote for a $p57^{kip2}$ gene deletion ($p57^{-/+}$) provoked PE-like symptoms(14), such as, hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and excess trophoblast proliferation. $p57^{kip2}$ normally inhibits many cyclin/cyclin-dependent kinase complexes which are implicated in the trophoblastic cell cycle regulation. Impaired control of the trophoblastic cell proliferation is a key component of the abnormal placentation observed in PE(15). Furthermore, the $p57^{kip2}$ gene is paternally imprinted and expressed in both humans and mice(16), and the homozygous deletion of the gene is lethal(17).

The aim of this study was originally to elucidate the role of placental pathology in the development of PE-like symptoms in $p57^{-/+}$ mice. However, the blood pressure

and proteinuria changes reported by Kanayama's group(14) could not be reproduced by our team, even though the mice were obtained from the same laboratory. This implicates an environmental factor or a gene-environment effect in induction of the pathology. Our study relates the impact of diet and stress on PE-like symptoms development, and, moreover, the importance of environmental factors over genetics in initiation of the disease.

Materials and Methods

Animals. All experiments were performed on p57^{kip2} mice provided by Dr. Keiichi I. Nakayama from Kyushu University, Fukuoka, Japan. These animals were subsequently bred and maintained by backcrossing with C57BL/6 mice (Charles River, St-Constant, QC, CAN). Mouse genotype was determined, as done previously by Takahashi et al.(18). All animals, including the breeders, were kept on a 12-h light/dark cycle with water *ad libitum* and standard laboratory chow (Diet 2018 (N-A); Teklab Premier Laboratory Diets, Madison, WI) or standard Japanese laboratory chow (CA-1 (JPN); CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan). Mice in these experiments were 12-15 weeks of age, and their care met the standards set forth by the Canadian Council on Animal Care for the use of experimental animals. All procedures were approved by the University Animal Care Committee of the CHUM Research Centre.

To investigate the role of placental pathology in PE-like symptoms, female p57^{-/+} or wild type (p57^{+/+}) mice were time-mated with identical genotype male.

Indeed, Kanayama et al. (14) showed that when $p57^{-/+}$ females were bred with $p57^{-/+}$ males, they developed PE-like symptoms.

Blood pressure measurement. Female mice were anesthetized with isoflurane and then implanted with TA11PA-C10 radiotelemeters (Data Sciences International, St. Paul, MN) in the left carotid artery for the direct measurement of arterial pressure (AP) and heart rate (HR), as described previously(19). The mice were given 7-10 days to recover, after which HR and AP were recorded for 3 consecutive days. Male mice were then placed in the cages for timed mating. Gestation was confirmed by the presence of a vaginal plug and was considered day 1. Starting on this day, AP and HR were measured every 2 days until pups were born. To assess the impact of immobilization stress, AP and HR were measured continuously for 1 hour prior to and during 30-minute immobilization in a restraining device (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA). This procedure was undertaken before and at day 18 of gestation.

Proteinuria. Urine samples were collected by briefly restraining the mice manually and directly retrieving urine in 1.5-ml tubes(20). This method avoids the unnecessary stress of placing the animals in metabolic cages for 24 hours. It has been shown that mice of both sex present a significant rise in mean AP (MAP) and HR when placed in metabolic cages(21). Samples were taken in all mice before and at day 18 of gestation and they were kept frozen at -80°C until assayed. For mice being assessed by telemetry, urine was collected on days where AP was not recorded.

Albumin and creatinine urinary concentrations were measured with the Albuwell and Creatinine companion mouse ELISA kits (Exocell, Philadelphia, PA), according to the manufacturer's protocol. Each sample was thawed and diluted 1:10 before measurement in duplicate. Proteinuria was evaluated as the albumin/creatinine ratio.

Tissue collection and histology. On day 18 of gestation, the mice were anesthetized with ketamine/xylazine. Kidneys, heart, placentas and pups were all weighed individually, and tails from the pups were snipped for genotyping. Kidneys and placentas were then placed overnight in 4% paraformaldehyde for fixation. The next day, they were rinsed with phosphate buffer and embedded in paraffin. Kidneys and placentas were cut cross-sectionally in a microtome. Sections were stained with HPS to assess overall renal and placental morphology. Embedding, sectioning and staining were performed by the histology platform of the Research Institute in Immunology and Cancerology at the Université of Montréal.

Placental alterations were characterized by 5 criteria: necrosis, hyalinization, microcalcification, giant cell island loss and labyrinthine trophoblast structure loss. For each criterion, changes were assigned a score from 0 to 3, where 0 was the absence of, 1 was mild, 2 was moderate, and 3 was a severe alteration. Furthermore, all scores were summed up for total evaluation of the placental pathology present. The investigator scoring the placentas was blinded to the genotype of the pups and mothers to avoid any bias.

Placental expression of p57^{kip2}. As p57^{kip2} is a paternally imprinted gene(16), p57^{+/-} mice may express or not the gene depending on from which parent it was inherited from. Hence, we determined RNA expression of p57^{kip2} by PCR. For placentas evaluated histologically, p57 expression was determined in the respective pups. To do so, RNA from the placentas was extracted with Trizol. Single-stranded cDNA was synthesized by reverse-transcriptase reaction with M-MLV (Invitrogen, Burlington, ON, CAN). Polymerase chain reaction was performed with specific primers for p57 (forward (F) (5'-TGCACTGAGAGCGAGTAGAGATT-3'); reverse (R) (5'-TAGAGGCTAACGGCCAGAGA-3')) and 18s (F (5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'); R (5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3')) using Taq polymerase (Invitrogen, Burlington, ON, CAN).

Vessel reactivity. During tissue collection, the mesentery was removed and placed in cold Krebs solution (118.6 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 25.1 mM NaHCO₃, 26 µM EDTA, 0.18% Glucose, 2.5 mM CaCl₂). A segment of the mesenteric artery was isolated, then transferred to an arteriograph chamber filled with oxygenated Krebs and mounted on glass capillaries, as described by Takase et al.(22). The artery was then perfused intraluminally and equilibrated at constant 30 mmHg pressure for 45 minutes before the experiments. Vascular reactivity was studied under 4 protocols and dose-response curves were charted: 1. Norepinephrine (10⁻⁹ to 10⁻⁵ M), 2. Acetylcholine (10⁻⁹ to 10⁻⁴ M), 3. sodium nitroprusside (SNP) (10⁻⁹ to 10⁻⁴ M), and 4. Endothelin-1 (10⁻¹¹ to 10⁻⁸ M). All drugs were administered extraluminally, and each protocol was separated by a 30-minute

wash-out period to allow vessel diameter to return to baseline values. Prior to vasodilatation measurements, the artery was precontracted at about 70% of its equilibration diameter with an appropriate amount of norepinephrine.

Drugs. The following drugs were purchased for mouse anesthesia: ketamine (Bimeda-MTC, Cambridge, ON, CAN), xylazine (Bayer, Toronto, ON, CAN) and isoflurane (Abbott, St-Laurent, QC, CAN). For vessel reactivity, the following drugs were dissolved in distilled water and diluted with Krebs' solution: arterenol bitartrate salt (norepinephrine) (Sigma A-0937, Oakville, ON, CAN); acetylcholine chloride (Sigma A-6625, Oakville, ON, CAN); SNP (Calbiochem 567538, Mississauga, ON, CAN); endothelin-1, human, porcine (Sigma E-7764, Oakville, ON, CAN).

Statistical analysis. All data are expressed as means \pm SE. Two-way ANOVA was used to determine the impact of diet and genotype on most parameters. However, repeated-measures ANOVA were performed to assess the impact on vessel reactivity and the effect of immobilization stress, followed by Tukey's post-hoc test when an interaction was detected. Placental pathology scores were analyzed by non-parametric Mann-Whitney U-tests.

Results

AP and proteinuria were first quantified during gestation to confirm the phenotype observed by Kanayama et al.(14). To our surprise, we detected no increases in AP in $p57^{-/+}$ mice during pregnancy. Indeed, MAP was 99 ± 2 and 92 ± 5 mmHg at baseline, and 107 ± 4 and 108 ± 7 mmHg in $p57^{+/+}$ ($n = 3$) and $p57^{-/+}$ ($n = 5$) mice, respectively.

Furthermore, we found no changes in proteinuria during gestation as the albumin/creatinine ratio ranged from 1.48 ± 0.29 and 1.57 ± 0.27 at baseline to 2.93 ± 1.4 and 3.65 ± 1.09 at day 18 of gestation in $p57^{-/+}$ ($n = 5$) and $p57^{+/+}$ ($n = 6$) mice, respectively. This is in contrast to the data published by Kanayama's group who reported a 30-mmHg increase in systolic blood pressure and about 10-fold elevation in urinary protein excretion. However, we did note some phenotypes similar to those reported previously. Indeed, pronounced placental pathology could be seen in placentas that did not express $p57^{kip2}$ (Figure 1). Furthermore, $p57^{-/+}$ mothers had significantly smaller litters than $p57^{+/+}$ mice, as they carried an average of 6.6 ± 0.7 fetuses compared to 9.1 ± 0.6 fetuses in $p57^{+/+}$ mice (Table 1). In addition, non-viable fetuses were apparent in $p57^{-/+}$ pregnancies while this phenomenon was not present in $p57^{+/+}$ controls (Table 1). However, we did not observe any preterm delivery in the $p57^{-/+}$, as previously reported(14). Indeed, in our study, all mice gave birth, on average, at 20 days of gestation.

As the mice in our study came from the same source as in Kanayama's paper and were maintained on the same background (C57Bl/6), their genetic backgrounds were the same. This implicated an environmental factor in the differences observed in our 2 groups. Therefore, we investigated the role of diet in these mice. Indeed, the rodent chow fed in Japan (JPN) is very different in content from that of North American (N-A) (Table 2a and 2b). Interestingly, although fat and fibre content were the same, protein content was much greater in the JPN diet: 26.8% compared to 18.9% in the N-A diet. Also, noticeably, sodium content in the JPN diet was twice that of the N-A diet (0.41 vs. 0.23 g/100 g). Hence, the potassium/sodium ratio was decreased in the JPN diet (2.28 vs. 2.96). In addition, folic acid content was lower in the JPN diet (0.24 vs. 0.33). We thus repeated the afore-mentioned experiments in mice born from parents fed the JPN diet. Indeed, previous papers have reported that diet may affect phenotype in specific strains of rodents(23).

Unfortunately, mice placed on the JPN diet did not exhibit any increase in MAP with pregnancy as baseline values were 95 ± 4 and 94 ± 2 mmHg and 120 ± 7 and 111 ± 6 mmHg at the end of gestation in $p57^{+/+}$ ($n = 5$) and $p57^{-/+}$ ($n = 7$) mice, respectively. Furthermore, we did not detect any increase in proteinuria, as the albumin/creatinine ratio were 1.55 ± 0.37 and 2.44 ± 1.68 at baseline and 1.04 ± 0.21 and 5.58 ± 3.21 at day 18 of gestation for $p57^{-/+}$ and $p57^{+/+}$ mice, respectively. The change of diet also had no significant effect on hematocrit values (Table 3).

However, mice on the JPN diet were smaller before and at the end of pregnancy, than those on the N-A diet, independently of genotype (Table 3). Furthermore, as expected, heart mass was lower (Table 4) in mice receiving the JPN diet compared to those on the N-A diet while the heart-to-body weight ratio was unaffected (Table 3). Interestingly, left ventricle (LV) weight was not different in mice fed the JPN diet in comparison to those receiving the N-A diet, although all other compartments were significantly smaller (Table 4). Furthermore, when looking at the LV-to-body-weight ratio, we observed a significant increase with the JPN diet (Table 4) again, independently of genotype.

In addition, even though mice on the JPN diet were smaller, their kidneys were significantly larger, in both $p57^{+/+}$ and $p57^{-/+}$; thus, the kidney-to-body-weight ratio was significantly increased (Table 3). However, histological analysis of the kidneys did not reveal any signs of noticeable associated pathology.

In addition, we confirmed that placental pathology was present mainly in placentas that did not express $p57^{kip2}$ mRNA independently of the diet given to their mothers (Table 5). This seemed to be due to the significant presence of a labyrinthine trophoblast structure loss and microcalcification. This loss of labyrinthine structure is most probably as a result of an increased trophoblastic proliferation, as has been reported previously(14). Interestingly, although total placental pathology was not increased with diet in the $p57^{-/+}$ mice, we did observe a higher incidence of microcalcification in placentas from these mothers (Table 5). Furthermore, we did find

a higher incidence of pathology in placentas expressing $p57^{kip2}$ from $p57^{+/+}$ females fed the JPN diet (Table 5).

Additionally, to better characterize the impact of diet on blood pressure regulation, we investigated the vessel reactivity of mesenteric arteries collected at the end of gestation. We noted that the JPN diet had a negative impact on endothelial function. Indeed, vessels from $p57^{-/+}$ mice fed the JPN diet were more responsive to norepinephrine (Figure 2) than $p57^{+/+}$ mice as well as mice receiving the N-A diet. Furthermore, arteries from $p57^{+/+}$ mice on the JPN diet were less reactive to both acetylcholine (Figure 3A) and SNP (Figure 3B). In addition, they were less responsive to acetylcholine than their $p57^{-/+}$ littermates. No effect of diet or genotype was observed in response to endothelin (data not shown).

Kanayama's group used the tail-cuff method to assess AP, whereas we used telemetry. To investigate the impact of immobilization stress on the AP of our mice fed the JPN diet, we placed them in a restraining device before and at the end of gestation. Although they reacted similarly to immobilization stress before gestation, differences could be seen at 18 days of gestation. Indeed, no significant change in MAP could be found in the $p57^{+/+}$ mice throughout the stress while a significant MAP decrease was observed in the $p57^{-/+}$ mice (Figure 4). Moreover, no change in response to immobilization stress was observed with gestation.

Discussion

The main finding of this study was that genetic predisposition and placental pathology were not sufficient to induce PE-like symptoms. Indeed, we demonstrated that mice with the same genetic background did not develop the disease under different environmental conditions. In fact, while Kanayama's group showed that $p57^{kip2}$ deficiency provoked PE-like symptoms(14), their results could not be replicated in our laboratory, indicating that environmental factors might have been implicated in triggering the pathology.

This study also revealed that placental pathology is not sufficient to generate PE-like symptoms, as it was observed in $p57^{-/+}$ mice without any rise in AP and proteinuria. Indeed, abnormal placentation is thought by many groups to be central in the development of PE(4). In humans, placental pathology in PE is usually characterized by impaired remodelling and trophoblastic invasion of the uterine spiral arteries(24), which results in decreased placental perfusion. This is well illustrated by the fact that surgical reduction of uterine perfusion during pregnancy in rats results in PE-like symptoms(25). In addition, necrosis of syncytiotrophoblasts(26) and marked proliferation of cytotrophoblasts(26;27) are also usually observed. Histological analysis of placental tissue in $p57^{-/+}$ mice uncovered necrosis, hyalinization, microcalcification, loss of giant cell islands and labyrinthine trophoblast structure. We can, therefore, establish that the placental pathology we encountered is typical of PE, although it did not produce the disease.

The fact that we used mice from the same genetic background and could not reproduce the model described in Kanayama's paper suggested that environmental factors may be implicated in the development of PE. The diets used by our 2 groups were evidently different as the main components were clearly dissimilar, for example, in ion concentrations. Indeed, the JPN diet contains more sodium, iron, and the potassium-to-sodium ratio is lower in comparison to the N-A diet. Sodium could have been involved in the increase of AP, since its content is higher in the JPN diet, and sodium intake has been related to the development of hypertension(28). Indeed, sodium retention is a characteristic of PE, but sodium intake does not affect the incidence of PE(29). However, it has been reported that high sodium diet is associated with an increase in vascular reactivity in pregnant rats(30). Normal pregnancy is known to be an inflammatory state which is also known to be more pronounced in PE(31). Some nutrients such as vitamin E decrease the inflammatory response, and iron status can influence it by catalyzing free radical formation and therefore cytokine production(32). Interestingly, the N-A diet had more vitamin E than the JPN diet, which might have protected the p57^{-/+} mice on the N-A in our study.

Although the JPN diet did not enhance AP or proteinuria, it did have other impacts on the mice and may have been implicated in development of the disease. First, mice receiving the JPN diet were smaller at the beginning and end of gestation, than those on N-A diet. Furthermore, although the heart-to-body-weight ratio was not different, LV-to-body-weight ratio was increased which suggest that mice fed the JPN

diet are developing left ventricular hypertrophy, which might reflect underlying cardiovascular pathologies.

Furthermore, an increase in the kidney-to-body-weight ratio was observed in animals receiving the JPN diet, suggesting that the diet may affect kidney function. However, there was no indication of renal pathology by histology in the $p57^{-/+}$ mice, on any diet, contrarily to what had been previously published(14). Indeed, PE is often associated with kidney glomerulosclerosis, which leads to proteinuria(4). Since no proteinuria was apparent in this model in our laboratory, we think that the diet, in addition to another environmental factor, could trigger kidney physiopathology, leading to proteinuria as was observed by Kanayama et al(14). It is possible that the use of metabolic cages for the urine collection may have contributed to this. Indeed, it has been shown that females present a significant rise in MAP and HR when placed in metabolic cages(21). Hence, as the mice were placed many times in these cages for urine collection for the Japanese study, it is possible that it may have produced an increase in BP which may have triggered renal problems.

In addition, although all $p57^{-/+}$ mice had smaller litters, this was accentuated by the JPN diet reflecting intrauterine growth restriction in these litters, which is often found in PE(33). However, the placental pathology observed in $p57^{-/+}$ mice was not worsened by the JPN diet, although $p57^{+/+}$ animals showed elevated symptoms when compared to those on the N-A diet. These results indicate a role of diet in the development of placental pathology.

Furthermore, all mice receiving the JPN diet manifested endothelial dysfunction compared to those on the N-A diet. Indeed, many authors have reported an impaired response to vasodilators and chronic vasoconstriction during preeclamptic pregnancies, which could thus be implicated in the development of hypertension in this disease(34). Since the JPN diet had almost twice the amount of sodium than that contained in the N-A diet, we can hypothesize that it might have impaired vascular reactivity as it has been demonstrated that endothelium-dependent vascular relaxation is diminished in pregnant rats receiving a high sodium diet(30). This further suggests that the JPN diet may have indeed been an environmental factor involved in our model.

Another factor that may have contributed to the results obtained by Kanayama's group was the method of AP assessment. Indeed, AP was measured by the tail-cuff in Kanayama's laboratory. This method requires the mice to be restrained as well as human presence. In certain strains, the increased AP observed may be the product of greater sensitivity to stress(35;36). Telemetry has been shown to be the best way to measure accurately AP in mice(37). To assess the impact of this stress, $p57^{-/+}$ and $p57^{+/+}$ mice receiving the JPN diet and assessed by telemetry underwent immobilization stress before and at the end of gestation. Although restraint in $p57^{+/+}$ mice caused the usual AP rise, this reaction was lessened in $p57^{-/+}$ animals at the end of gestation, suggesting that AP measurement may not be the culprit in the development of hypertension in the $p57^{-/+}$ model in Japan. Supporting these results,

Baker's group(38) recently reported that no difference in systolic AP could be observed in pregnant $p57^{-/+}$ mice in their laboratory, even though they also assessed AP by tail-cuff. Taken together with the fact that no difference was observed before and at the end of gestation in $p57^{-/+}$ mice, we suggest that the AP method was not the main factor implicated in the development of PE-like symptoms in these animals.

Determining the exact environmental factor that triggered PE-like symptoms in the $p57^{-/+}$ model in Japan would be almost impossible. Indeed, many factors, put together or alone, may have been implicated in the development of the disease. For instance, it would be extremely difficult to determine the exact ion composition of the water in the animal facilities at the time they made the study. Furthermore, it would be unfeasible for us to verify every single parameter in their animal facility that may be implicated, such as routine mouse handling and luminosity of the room in which the mice were housed during experimentation. Rodents are very sensitive to environmental changes and their blood pressure is easily altered by human presence, noise and stress. Put together with the diet, any of these factors may have triggered the release of factors implicated in the rise in BP in these animals.

PE has been thought to be caused by abnormal placentation in many studies. It is thus important to acknowledge that placental pathology may be responsible for the development of PE but is not sufficient by itself to trigger the disease. Furthermore, even though diet did not induce PE-like symptoms, it surely contributed to the disease, as it induced endothelial dysfunction and placental pathology, landmarks of PE.

Moreover, diet might have influenced renal pathology, as although no kidney histological pathology could be detected, kidney hypertrophy was present, which could have become pathological if another risk factor, such as hypertension, was added. Hence, we can think of PE as a pathology that needs a certain level of factors to be triggered, and, thus, our study shows that diet brought us closer to the threshold. Further experiments are required to assess the implication of environmental factors in PE. Indeed, there is presently no treatment for this disease which is the most common cause of maternal and fetal death. Hence, given that environment can be controlled, better knowledge could strongly impact its treatment. By revealing environmental aspects implicated in the trigger of PE, clinicians would be able to better prevent it in women at high risk.

Acknowledgments

We thank Dr. Louis Gaboury for his help in the evaluation of pathological symptoms present in placentas and kidneys. We also thank Catherine Michel for her excellent technical assistance in all the mice studies. We are indebted to Dr. Johanne Tremblay for her guidance and for letting us use her telemetry equipment.

Grants

This research was supported by grants from the Canadian Institutes of Health and Research (CIHR) and Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

Diet	Mother's genotype	Placental weight (mg)	Pup weight (mg)	Pups/litter (average)	Non-viable fetus
N-A	p57 ^{-/+}	112.0 ± 8.5	741.3 ± 39.9	6.6 ± 0.7†	1.6 ± 0.4†
	p57 ^{+/+}	99.2 ± 1.9	802.9 ± 21.6	9.1 ± 0.6	0.0 ± 0.0
JPN	p57 ^{-/+}	112.2 ± 4.5	887.4 ± 49.7*†	4.0 ± 1.2†*	1.7 ± 0.9†
	p57 ^{+/+}	111.7 ± 3.2	662.0 ± 37.9§	8.1 ± 0.9*	0.0 ± 0.0

Table 1. Characteristics of pups and placentas in p57 mice on the JPN vs the N-A rodent diet.

Values expressed as means ± SE. N for placental and fetal weight are as follows: p57^{-/+} – JPN (25), p57^{+/+} – JPN (57), p57^{-/+} – N-A (31) and p57^{+/+} – N-A (94). * $p \leq 0.05$ and § $p \leq 0.001$, statistically different from mice on the N-A diet; † $p \leq 0.001$, statistically different from p57^{+/+} mice.

Nutrients (%)					Minerals (per 100 g of diet)							
Diet	Protein	Fat	Fibre	Ca	P (g)	K (g)	Mn	Fe	Cu	Zn	Na	K/Na
				(g)			(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(g)	
N-A	18.9	5.0	3.8	1.01	0.65	0.68	11.8	22.6	1.52	7.7	0.23	2.96
JPN	26.8	5.0	3.4	1.48	1.21	0.94	10.45	30.73	0.54	5.35	0.41	2.28

Table 2a. Composition of the N-A and JPN rodent diets.

Vitamins (per 100 g diet)									
Diet	Retinol	Vit. B6	Vit. C	Vit. E	Niacin	Folic acid	Choline	Biotin	Inositol
	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(g)	(µg)	(mg)
N-A	0.47	1.85	0.0	10.1	4.12	0.33	0.11	30.0	145.5
JPN	1.31	1.13	16.0	6.9	17.1	0.24	0.21	38.5	515.0

Table 2b. Vitamin composition of the N-A and JPN rodent diets. Vit, vitamin

Diet	Mother's genotype	N	BW (g) (Baseline)	BW (g) (end of gestation)	Heart/BW ratio	Kidney/BW ratio	Htc (%)
N-A	p57 ^{-/+}	14	23.2 ± 0.9	35.8 ± 1.0§	6.08 ± 0.48	7.23 ± 0.25	45.5 ± 2.0
	p57 ^{+/+}	15	23.7 ± 0.7	39.4 ± 1.3	6.19 ± 0.81	7.08 ± 0.18	43.1 ± 5.0
JPN	p57 ^{-/+}	7	19.4 ± 0.5†	30.5 ± 2.2*§	7.01 ± 0.45	9.67 ± 0.41‡	49.5 ± 4.8
	p57 ^{+/+}	7	21.4 ± 0.7†	34.4 ± 1.5*	6.41 ± 0.21	9.17 ± 0.23‡	39.5 ± 10.8

Table 3. Characteristics of female p57 mice on the JPN diet vs N-A rodent diet.

Values expressed as means ± SE. * $p \leq 0.05$, † $p \leq 0.005$ and ‡ $p \leq 0.001$, statistically different from mice on the N-A diet; § $p \leq 0.05$, statistically different from p57^{+/+} mice. BW, body weight; Htc, hematocrit.

Diet	Mother's genotype	N	Heart (mg)	LV (mg)	LV/BW ratio	RV (mg)	LA (mg)	RA (mg)
N-A	p57 ^{-/+}	7	149 ± 5	90 ± 3	4.1 ± 0.3	27.2 ± 1.2	3.5 ± 0.4	3.5 ± 0.4
	p57 ^{+/+}	5	153 ± 6	92 ± 4	4.1 ± 0.2	26.0 ± 1.4	3.9 ± 0.4	3.9 ± 0.4
JPN	p57 ^{-/+}	7	136 ± 8*	93 ± 4	4.8 ± 0.7*	18.1 ± 1.8†	2.9 ± 0.3*	2.9 ± 0.3*
	p57 ^{+/+}	6	137 ± 6*	96 ± 6	4.5 ± 0.2*	22.6 ± 1.6†	2.8 ± 0.3*	2.8 ± 0.3*

Table 4. Weight of the whole heart and compartments in female p57 mice on the JPN diet vs N-A rodent diet.

Values expressed as means ± SE. * $p \leq 0.05$, † $p \leq 0.001$, statistically different from mice on the N-A diet. BW, body weight; LA, left atria; LV, left ventricle; RA, right atria; RV, right ventricle.

Placental pathology parameters														
Diet	Placental p57	N	Necrosis		Hyalinization		Microcal.		GCIL		LLTS		Total	
			Mdn	75 %	Mdn	75 %	Mdn	75 %	Mdn	75 %	Mdn	75 %	Mdn	75 %
N-A	No	8	0.5*	2.0	2.5§	3.0	0.0*	0.3	1.0*	1.0	1.0†	1.0	6.5§	7.0
	Yes	14	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	1.3
JPN	No	4	0.0	0.3	1.5	2.0	2.0‡ ^b	2.0	1.0	1.3	1.0*	1.0	6.0†	7.0
	Yes	6	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0	0.8	2.5 ^a	3.0

Table 5. Characterization of placental pathology in p57^{+/-} mothers according to placental p57 expression.

P57 placenta expression was determined by RT-PCR in respective pups. Yes, indicates pups that were genotyped p57^{+/+} or p57^{+/-} who expressed p57, whereas No, indicates pups genotyped p57^{-/-} or p57^{+/-} that did not express p57. Indeed, as p57 is a paternally-imprinted gene, it is expressed depending on the parental origin. Values are expressed as means \pm SE. * $p \leq 0.05$, † $p \leq 0.01$, ‡ $p \leq 0.005$ and § $p \leq 0.001$, statistically different from p57^{+/+} mice; ^a $p \leq 0.05$, ^b $p \leq 0.005$, statistically different from the N-A diet. GCIL, giant cell island loss; Microcal., microcalcification; LLTS, labyrinthine trophoblast structure loss.

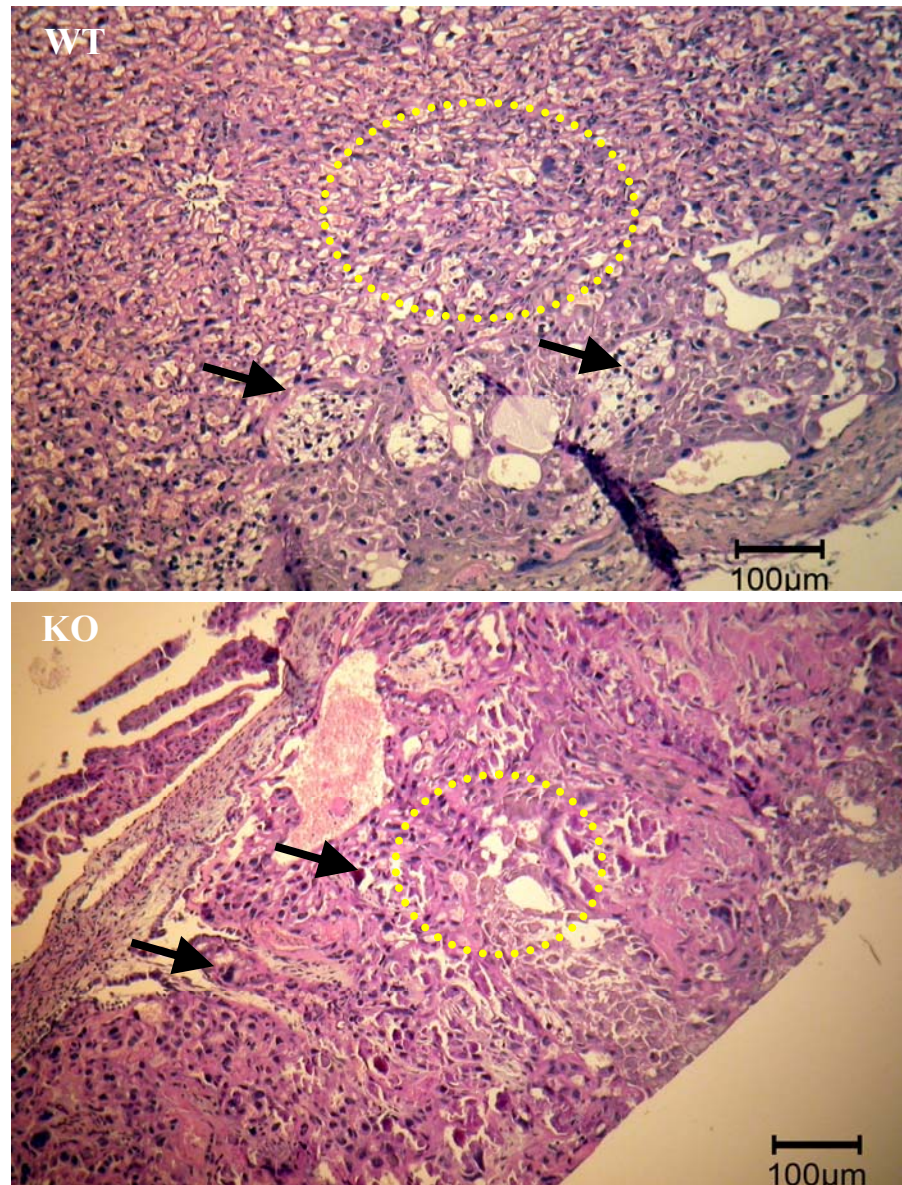


Figure 1. Histology of placentas from $p57^{+/+}$ vs homozygote $p57^{-/-}$ pups.

These images demonstrate typical HPS staining in placentas from $p57^{+/+}$ and homozygote $p57^{-/-}$ pups. Placental pathology can be clearly observed in $p57^{-/-}$ placentas characterized by loss of spongiotrophoblast structure (dashed yellow circle on KO panel), giant cell island loss and microcalcification (black arrows on KO panel). Normal placental morphology and giant cell islands are identified by a yellow dashed circle and black arrows, respectively, on the WT panel.

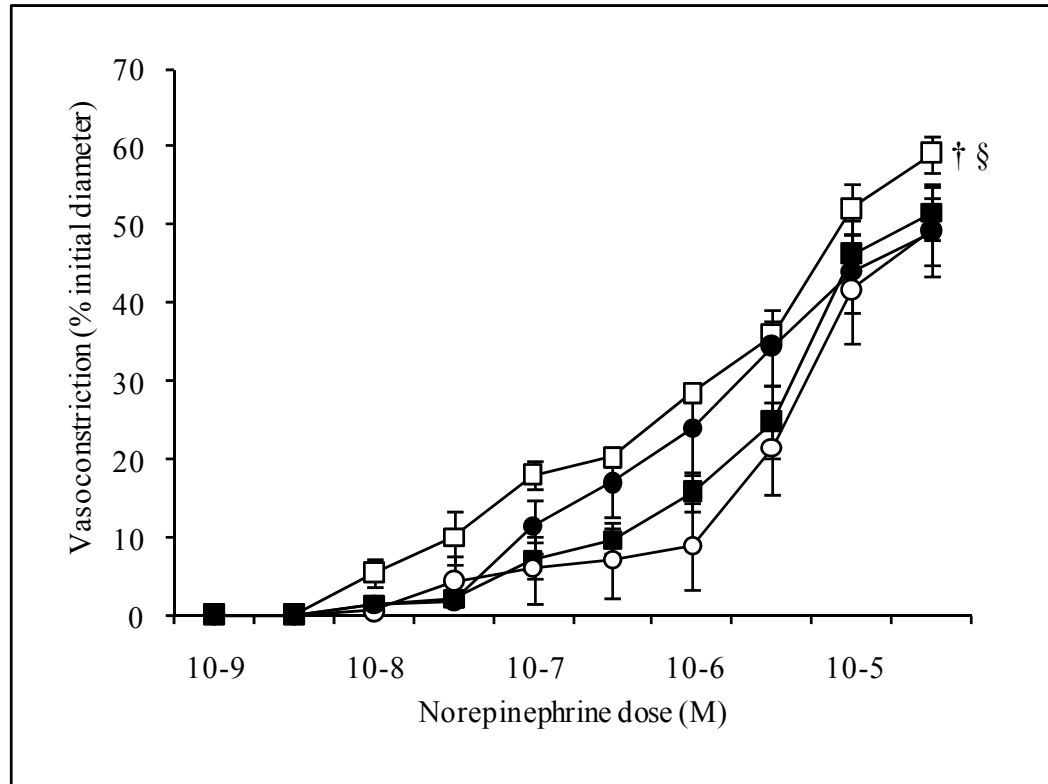


Figure 2. Vessel response to norepinephrine *in vitro*.

Mesenteric arteries from p57^{-/+} mice (squares) on the JPN diet (white) showed significantly more contraction in response to norepinephrine than those on the N-A diet (black). Also, p57^{-/+} mice manifested an increased response compared to p57^{+/+} controls (circles) when fed the JPN diet. The n for each group is as follows: p57^{-/+} – JPN (4), p57^{+/+} – JPN (6), p57^{-/+} – N-A (7) and p57^{+/+} – N-A (5). † $p \leq 0.005$, statistically different from mice on the N-A diet; § $p \leq 0.05$, statistically different from p57^{+/+} mice.

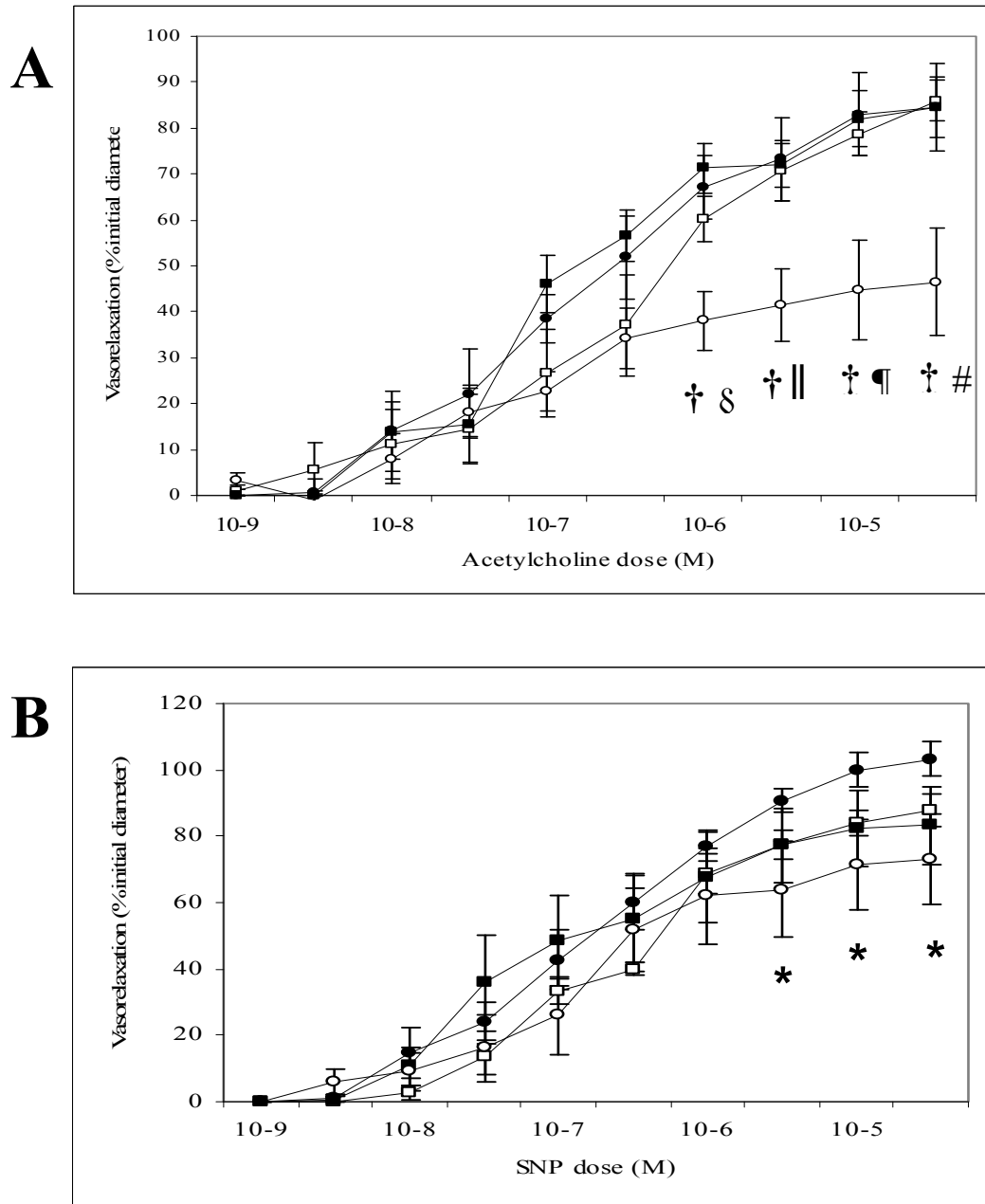


Figure 3. Vessel response to vasodilators *in vitro*.

$P57^{+/+}$ mice (circles) responded less to acetylcholine (A) than $p57^{-/+}$ animals (squares) when placed on the JPN diet (white). Also, $p57^{+/+}$ mice on the JPN diet relaxed less in response to both acetylcholine (A) and SNP (B) compared to those on the N-A diet (black). The n for each group is as follows: $p57^{-/+}$ – JPN (4), $p57^{+/+}$ – JPN (6), $p57^{-/+}$ – N-A (7) and $p57^{+/+}$ – N-A (5). * $p \leq 0.05$, statistically different from mice on the N-A diet; § $p \leq 0.05$, statistically different from $p57^{-/+}$ mice.

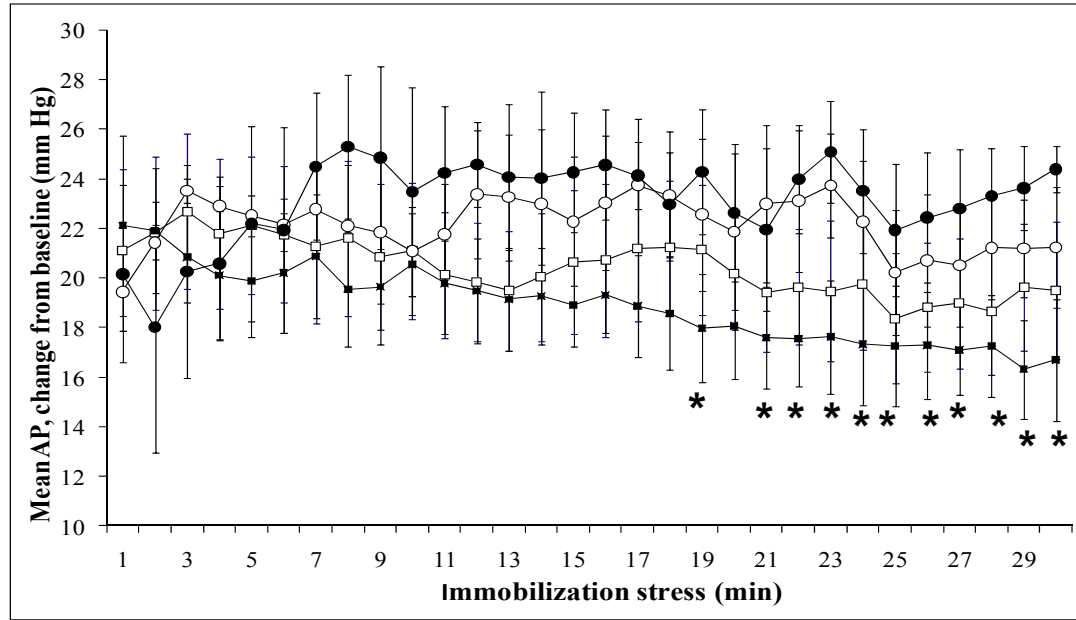


Figure 4. Vessel response to vasodilators *in vitro*.

To determine the sensitivity of p57^{-/+} (squares; n = 10) compared to their p57^{+/+} (circles; n = 6) siblings to immobilization stress, the mice were placed in a restraining device for 30 minutes before (white) and at the end (black) of gestation while AP was measured by radiotelemetry. * $p \leq 0.01$, significantly different from the 2-minute timepoint.

References

- (1) Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; 365(9461):785-799.
- (2) Moutquin JM, Garner PR, Burrows RF, Rey E, Helewa ME, Lange IR, Rabkin SW. Report of the Canadian Hypertension Society Consensus Conference: 2. Nonpharmacologic management and prevention of hypertensive disorders in pregnancy. *CMAJ* 1997; 157(7):907-919.
- (3) Roberts JM, Lain KY. Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta* 2002; 23(5):359-372.
- (4) Cross JC. The genetics of pre-eclampsia: a feto-placental or maternal problem? *Clin Genet* 2003; 64(2):96-103.
- (5) Roberts JM, Balk JL, Bodnar LM, Belizan JM, Bergel E, Martinez A. Nutrient involvement in preeclampsia. *J Nutr* 2003; 133(5 Suppl 2):1684S-1692S.
- (6) Haelterman E, Marcoux S, Croteau A, Dramaix M. Population-based study on occupational risk factors for preeclampsia and gestational hypertension. *Scand J Work Environ Health* 2007; 33(4):304-317.
- (7) Klonoff-Cohen HS, Cross JL, Pieper CF. Job stress and preeclampsia. *Epidemiology* 1996; 7(3):245-249.
- (8) Landsbergis PA, Hatch MC. Psychosocial work stress and pregnancy-induced hypertension. *Epidemiology* 1996; 7(4):346-351.
- (9) Leeners B, Neumaier-Wagner P, Kuse S, Stiller R, Rath W. Emotional stress and the risk to develop hypertensive diseases in pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 2007; 26(2):211-226.

- (10) Schobel HP, Fischer T, Heuszer K, Geiger H, Schmieder RE. Preeclampsia -- a state of sympathetic overactivity. *N Engl J Med* 1996; 335(20):1480-1485.
- (11) Coussons-Read ME, Okun ML, Nettles CD. Psychosocial stress increases inflammatory markers and alters cytokine production across pregnancy. *Brain Behav Immun* 2007; 21(3):343-350.
- (12) Mulder EJ, Robles de Medina PG, Huizink AC, Van den Bergh BR, Buitelaar JK, Visser GH. Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child. *Early Hum Dev* 2002; 70(1-2):3-14.
- (13) Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2001; 2(7):538-548.
- (14) Kanayama N, Takahashi K, Matsuura T, Sugimura M, Kobayashi T, Moniwa N, Tomita M, Nakayama K. Deficiency in p57Kip2 expression induces preeclampsia-like symptoms in mice. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(12):1129-1135.
- (15) Fisher SJ. The placental problem: linking abnormal cytotrophoblast differentiation to the maternal symptoms of preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2(1):53.
- (16) Hatada I, Mukai T. Genomic imprinting of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in mouse. *Nat Genet* 1995; 11(2):204-206.
- (17) Zhang P, Liegeois NJ, Wong C, Finegold M, Hou H, Thompson JC, Silverman A, Harper JW, DePinho RA, Elledge SJ. Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 1997; 387(6629):151-158.
- (18) Takahashi K, Nakayama K, Nakayama K. Mice lacking a CDK inhibitor, p57Kip2, exhibit skeletal abnormalities and growth retardation. *J Biochem (Tokyo)* 2000; 127(1):73-83.

- (19) Lavoie JL. Pression artérielle chez la souris avec un nouveau transmetteur miniaturisé. *Sci Tech Anim Lab* 2006; 4(3):1-3.
- (20) Falcao S, Bisotto S, Gutkowska J, Lavoie JL. Hyperhomocysteinemia is not sufficient to cause preeclampsia in an animal model; the importance of folate intake. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2008; In Press.
- (21) Hoppe CC, Moritz KM, Fitzgerald SM, Bertram JF, Evans RG. Transient hypertension and sustained tachycardia in mice housed individually in metabolism cages. *Physiol Res* 2008.
- (22) Takase H, Moreau P, Kung CF, Nava E, Luscher TF. Antihypertensive therapy prevents endothelial dysfunction in chronic nitric oxide deficiency. Effect of verapamil and trandolapril. *Hypertension* 1996; 27(1):25-31.
- (23) Wexler BC. Low protein fish vs low protein animal diet enhances the propensity for stroke in stroke-prone/SHR. *Stroke* 1983; 14(4):585-590.
- (24) Morgan T, Ward K. New insights into the genetics of preeclampsia. *Semin Perinatol* 1999; 23(1):14-23.
- (25) Alexander BT, Kassab SE, Miller MT, Abram SR, Reckelhoff JF, Bennett WA, Granger JP. Reduced uterine perfusion pressure during pregnancy in the rat is associated with increases in arterial pressure and changes in renal nitric oxide. *Hypertension* 2001; 37(4):1191-1195.
- (26) Jones CJ, Fox H. An ultrastructural and ultrahistochemical study of the human placenta in maternal pre-eclampsia. *Placenta* 1980; 1(1):61-76.
- (27) Redline RW, Patterson P. Pre-eclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast. *Hum Pathol* 1995; 26(6):594-600.
- (28) Frohlich ED. The salt conundrum: a hypothesis. *Hypertension* 2007; 50(1):161-166.

- (29) Duley L, Henderson-Smart D, Meher S. Altered dietary salt for preventing pre-eclampsia, and its complications. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;(4):CD005548.
- (30) Barron LA, Giardina JB, Granger JP, Khalil RA. High-salt diet enhances vascular reactivity in pregnant rats with normal and reduced uterine perfusion pressure. *Hypertension* 2001; 38(3 Pt 2):730-735.
- (31) Redman CW, Sargent IL. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response -- a review. *Placenta* 2003; 24(Suppl A):S21-S27.
- (32) Grimble RF. Nutritional modulation of cytokine biology. *Nutrition* 1998; 14(7-8):634-640.
- (33) Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195(1):40-49.
- (34) Poston L. Endothelial dysfunction in pre-eclampsia. *Pharmacol Rep* 2006; 58 Suppl:69-74.
- (35) Pelaez LI, Manriquez MC, Nath KA, Romero JC, Juncos LA. Low-dose angiotensin II enhances pressor responses without causing sustained hypertension. *Hypertension* 2003; 42(4):798-801.
- (36) Gross V, Luft FC. Exercising restraint in measuring blood pressure in conscious mice. *Hypertension* 2003; 41(4):879-881.
- (37) Kurtz TW, Griffin KA, Bidani AK, Davisson RL, Hall JE. Recommendations for blood pressure measurement in animals: summary of an AHA scientific statement from the Council on High Blood Pressure Research, Professional and Public Education Subcommittee. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(3):478-479.

- (38) Knox KS, Baker JC. Genome-wide expression profiling of placentas in the p57Kip2 model of pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2007; 13(4):251-263.

Chapitre 9 – Mice overexpressing both human angiotensinogen and human renin as a model of preeclampsia

MICE OVEREXPRESSING BOTH HUMAN ANGIOTENSINOGEN AND HUMAN
RENIN AS A MODEL OF SUPERIMPOSED PREECLAMPSIA ON CHRONIC
HYPERTENSION

Stéphanie Falcao^{1, 2}, Ekatherina Stoyanova^{2, 3}, Guy Cloutier^{3, 4}, Roch Listz Maurice^{3, 4},
Jolanta Gutkowska^{1, 5}, Julie L. Lavoie^{1, 5}

¹Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM),
Montréal, Québec, Canada. ²Department of Biomedical Sciences, Université de
Montréal, Montréal, Québec, Canada. ³Laboratory of Biorheology and Medical
Ultrasonics, CRCHUM, Montréal, Québec, Canada. ⁴Department of Radiology,
Radio-Oncology and Nuclear Medicine, and Institute of Biomedical Engineering,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. ⁵Department of Medicine,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Publication: Falcao S, Stoyanova E, Cloutier G, Gutkowska J, Lavoie J.L. Mice
overexpressing both human angiotensinogen and human renin as a model of
preeclampsia. *Hypertension* 2009 Dec;54(6):1401-7.

Abstract

As hypertension is an important risk factor for preeclampsia, we investigated whether hypertensive mice which overexpress human renin and angiotensinogen develop superimposed preeclampsia. Preeclampsia is the major cause of maternal and fetal mortality/morbidity. However, the mechanisms underlying this disease are still poorly understood and thus, animal models are of great use to elucidate these. Blood pressure and proteinuria were measured by telemetry and ELISA respectively. Heart function was evaluated by echocardiography, while pathological cardiac hypertrophy-related genes were assessed by real-time PCR. Soluble fms-like tyrosine kinase-1 plasma concentrations was quantitated by ELISA and placental expression by real-time PCR. Transgenic mice develop *de novo* proteinuria during gestation and marked blood pressure elevation which are hallmarks of superimposed preeclampsia on chronic hypertension. Abnormal placentation present in these mothers produced a significant decrease in pup and placental weight, and was associated with an increased placental expression of soluble fms-like tyrosine kinase-1. We also found heightened circulating levels of this receptor, when adjusted for placental mass, as has been observed in women who suffer from preeclampsia. Cardiac hypertrophy could be observed in the transgenic mice, and was exacerbated by gestation. As a result, heart function was significantly decreased and markers of pathological hypertrophy were increased. Our data thus confirms the characterization of a new model of superimposed preeclampsia on chronic hypertension. Since chronically hypertensive women are at risk of developing the pathology, our model reflects a clinical reality and is thus an excellent

tool to elucidate and understand the molecular mechanisms triggering this widely-diagnosed disease.

Key words: preeclampsia, mouse model, renin-angiotensin system, cardiac hypertrophy, hypertension

Introduction

Preeclampsia (PE) has been studied extensively in the last 2 decades, as it is the most common cause of fetal and maternal mortality and morbidity(1). However, thus far, apart from delivery, there are no available treatments as anti-hypertensive medications are deleterious to the fetus(2). This human pregnancy-associated syndrome is characterised by the new occurrence of proteinuria and hypertension, in previously normotensive women, or a marked increase in blood pressure in hypertensive patient also called superimposed PE on chronic hypertension (SPE)(3). Other symptoms which can also be associated with this disease are placental pathology and cardiac hypertrophy(1;4). As it is difficult to predict disease onset, studies in humans are challenging and require a tremendous number of subjects to be of any significance. Moreover, few animal models develop PE spontaneously(5-7). As it has been suggested that PE may not be a homogenous disease, similarly to essential hypertension, many different animal models may be required to characterize the different faces of this pathology that is still so poorly understood.

The renin-angiotensin system (RAS) is postulated to be one of the mechanisms responsible for the development of PE(8). Indeed, although renin, angiotensinogen, angiotensin II (Ang II) and aldosterone plasma levels are elevated in pregnant women, response to vasoconstrictors is strikingly diminished(8). In contrast, PE is characterized by a heightened sensitivity to vasoconstrictors when compared to normal pregnancy(5;9) which in part may be explained by an upregulation of the AT1 receptors(10). Moreover, angiotensin receptor-activating autoantibodies (AT1-AA)

have been detected in the serum of preeclamptic women (10-13), and have been shown to specifically stimulate AT1 receptors and trigger the same pathways as Ang II. In addition, it is known that all RAS components are present in human placenta throughout pregnancy(14), which makes it a potential player in the modulation of maternal blood pressure. Based on these findings, a novel animal model of PE was characterized when transgenic female, mice (15) or rats(16) overexpressing human angiotensinogen were mated with males carrying the human renin gene (female hAogen X male hRen). Since angiotensinogen cleavage by renin is species-specific, both female and male mice which are single transgenics are normotensive. In this model, it has been shown that overexpression of the utero-placental RAS and release of placental human renin into the circulation triggers the PE-like symptoms in these rodents.

On the other hand, transgenic mice or rats overexpressing both human renin and human angiotensinogen (R^+A^+) have been developed in different laboratories and have been established as a model of hypertension (17-20). Indeed, male mice have elevated blood pressure, about 150 mmHg(17), and show high plasma levels of Ang II with evidence of end-organ damage such as endothelial dysfunction(21). Although these phenotypes have not been characterized in females, they should be similar as transgene expression is equivalent. Therefore, as chronic hypertension is an important risk factor for PE(22) , we hypothesised that hypertensive R^+A^+ double transgenic female mice would develop SPE, and could thus be an animal model of this clinical reality.

Materials and Methods

An expanded Materials and Methods section is available in the online data supplement at <http://hyper.ahajournals.org>.

Animals. R^+A^+ transgenic mice were produced by breeding heterozygous human renin (Ren9 line) mice(23) with heterozygous human angiotensinogen (204/1 line) mice(24). Both these single transgenic lines, obtained from Dr. Curt D. Sigmund at the University of Iowa, were maintained in our animal facility by backcrossing with C57BL/6 mice (Charles River, St-Constant, QC, Canada). The mouse genotype was determined as described previously(23;24). The animals were kept on a 12-h light/dark cycle with water and standard laboratory chow (2018; Teklab Premier Laboratory Diets, Madison, WI) *ad libitum*. Mice in these experiments were 12-15 weeks of age, and were separated in 4 groups (Non-pregnant R^+A^+ and R^-A^- ; Pregnant R^+A^+ and R^-A^-). Their care met the standards set forth by the Canadian Council on Animal Care for the use of experimental animals. All procedures were approved by the University Animal Care Committee of the CHUM Research Centre.

Blood pressure measurement. Arterial pressure (AP) and heart rate (HR) were directly measured by telemetry as done previously(25;26).

Proteinuria. Urine samples were collected before and on day 18 of gestation and albumin and creatinine concentrations were quantitated as described previously(25;26).

Tissue collection and histology. On day 18 of gestation, Blood was collected by heart puncture and placed in chilled 1.5 ml tubes containing EDTA (EMD, Gibbstown, NJ, USA). The pups were weighed, and their tails were cut and kept for genotyping. Kidneys, hearts, and placentas were all collected, weighed and either flash-frozen in liquid nitrogen or fixed until further assessed.

Plasma Ang II concentration. Plasma Ang II was concentrated using an extraction kit with C18 (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA). Reconstituted sample concentrations of Ang II were determined by radioimmunoassay utilizing a commercial kit (Peninsula Laboratories) using the directions and reagents supplied by the manufacturer.

Plasma sFlt-1 levels. Plasmatic fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) concentrations were measured using a commercial ELISA kit (R&D- Quantikine, Minneapolis, MN). Plasmas were diluted 1:20 in the manufacturer dilutor prior to measurements so that values were within the standard curve.

Echocardiography. Transthoracic echocardiographic studies were performed before and at the end of pregnancy. The mice were anesthetized by inhalation of

isoflurane 2-3% in oxygen, and then maintained on 2% isoflurane. Their hearts were investigated as previously described(27) by high-resolution ultrasound biomicroscopy (Vevo660; Visualsonics, Toronto, ON, Canada) equipped with 25-55 MHz probes that allow tracings of time-varying M-mode dimensions of the left ventricle (LV). The ejection fraction (EF), LV volumes, LV fractional shortening (FS), stroke volume (SV) as well as cardiac output (CO) were all calculated based on data acquired.

Western Blot. Protein samples were separated by electrophoresis and transferred on a nitrocellulose membrane. Proteins were detected using anti-PlGF-2 (Abcam, Cambridge, MA) using ECL West Pico kits (Pierce, Rockford, IL). Total protein was subsequently measured by staining of the membrane with Amido Black (Sigma, St-Louis, MO, USA). PlGF-2 signal was normalized to total protein for each band.

Real-time PCR. Brain natriuretic peptide (BNP) and NGF1-A-binding protein (Nab1) were both amplified in LV, while sFlt-1 was amplified in placentas. BNP and Nab1 are both reported to be specific markers of pathological cardiac hypertrophy, as they are markedly increased in this condition, whereas no differences are detected in physiological hypertrophy such as exercise training(28;29). Thus, their expression was measured to differentiate physiological heart hypertrophy in pregnancy from hypertension-derived pathological cardiac remodelling. Total RNA was extracted from frozen samples using Trizol (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol. Removal of genomic DNA, as well as reverse transcription

reaction and PCR were all done as previously described(30). mRNA levels were expressed as values relative to 18S mRNA.

Statistical analysis. All data are expressed as means \pm SE. The impact of pregnancy and genotype on most parameters was analyzed by 2-way ANOVA. Repeated-measures ANOVA were performed to assess the impact on blood pressure, albumin/creatinine ratio and cardiac parameters measured by echocardiography, followed by Tukey's post-hoc test when an interaction was detected. Placental pathology scores were analyzed by the non-parametric Mann-Whitney U-test, and changes in placental and pup weight were assessed by t-test. Real-time PCR values as well as plasma concentrations were analysed by one-way ANOVA. Furthermore, plasma sFlt-1 concentrations were analysed by one-way ANOVA using placental mass (total weight of all placentas in a litter) as a co-factor.

Results

There were no differences in age (82.6 ± 2.8 days vs 97.6 ± 7.4 days in $R^{-}A^{-}$ and $R^{+}A^{+}$ mice respectively) as well as in body weight both before and at the end of gestation (Please see <http://hyper.ahajournals.org>). As expected, we detected increased levels of Ang II in plasma from $R^{+}A^{+}$ mice collected at the end of gestation (334.7 ± 4.7 vs. 141.4 ± 2.6 pg/ml in $R^{+}A^{+}$ mice compared to $R^{-}A^{-}$, $p \leq 0.001$). Before pregnancy, it was noted that $R^{+}A^{+}$ mice had significantly higher MAP (134.2 ± 2.5 mmHg) when compared to $R^{-}A^{-}$ mice (99.7 ± 1.6 mmHg) as observed previously in

males(17). Concurrently, during gestation, the MAP was always significantly higher in our model as compared to their non-transgenic littermates (Please see <http://hyper.ahajournals.org>). Of interest, MAP increase in the $R^{+}A^{+}$ was significantly higher on days 5, 9, 11, 17 and at the end of gestation when compared to the $R^{-}A^{-}$ mice (Figure 1). Indeed, MAP at the end of gestation was 157.4 ± 4.9 , compared to 109.8 ± 3.9 mmHg in non-transgenic mice. In addition, MAP in $R^{+}A^{+}$ mice started decreasing by 24h post-partum and the change in MAP was no longer significantly different from $R^{-}A^{-}$ females (Figure 1). Furthermore, while the albumin/creatinine ratio in $R^{+}A^{+}$ mice were not different from the non-transgenic mice at baseline, they developed marked proteinuria by the end of gestation compared to $R^{-}A^{-}$ mice (Figure 2). To confirm that the proteinuria observed in the pregnant $R^{+}A^{+}$ was not simply due to disease progression with age in these mice, we also measured proteinuria in non-pregnant double transgenic mice of comparable age or older. Their albumin/creatinine ratio (0.414 ± 0.12) was not different from the levels observed in all mice before gestation. Furthermore, it was significantly lower than the ratio observed at the end of gestation (D18) in pregnant mice of the same genotype ($p \leq 0.05$). However, the proteinuria developed with gestation in the $R^{+}A^{+}$ mice was not accompanied by renal pathology as no glomerulosclerosis, endotheliosis or any other signs of nephropathy could be observed by our pathologist. Conversely, placental abnormalities were very pronounced in samples collected from $R^{+}A^{+}$ mothers in comparison to placentas from non-transgenic mice independently of pup genotype (Please see <http://hyper.ahajournals.org>). This severe placental pathology was characterized by increased necrosis and loss of labyrinthine trophoblast structure in samples collected

from R^+A^+ mice (Table 1), which resulted in a reduction of both pup and placental weight in comparison to non-transgenic mice (Table 2). We did not, however, observe any differences in litter size (6.9 ± 0.9 vs. 6.9 ± 0.8 for R^-A^- and R^+A^+ mothers respectively).

sFlt-1 mRNA expression was significantly increased in placentas from R^+A^+ mice (0.88 ± 0.22 , $n=7$) compared to non-transgenic (0.37 ± 0.12 , $n=8$) when expressed as sFlt1 to 18s ratio ($p < 0.05$). Furthermore, R^-A^- mice tended to have lower circulating levels of sFlt-1 compared to R^+A^+ (52792.20 ± 9165.48 vs 57652.93 ± 2110.89 pg/ml). However, given that we observed heightened placental expression in our transgenic mice, we further investigated this issue. As it is well known that increased circulating sFlt-1 levels during pregnancy originates from the placenta(31) and that mice have a variable number of pups/litter, we evaluated the role of the total placental mass in the levels of circulating sFlt-1. Doing so, we determined that, its plasmatic concentrations were significantly higher in R^+A^+ mice when total placental mass was used as a cofactor in 1-ANOVA analysis ($p \leq 0.05$). PlGF-2 protein expression was significantly decreased in placentas from R^+A^+ mothers (0.74 ± 0.10 , $n=5$) compared to those from R^-A^- mice (1.85 ± 0.37 , $n=5$) when expressed as PlGF-2 signal/total protein ($p < 0.05$).

Interestingly, at baseline, the heart-to-body weight ratio was significantly higher in R^+A^+ compared to R^-A^- mice. At the end of gestation, this ratio was also increased in non-transgenic mice, and the phenotype was exacerbated in R^+A^+ animals

(Figure 3). Statistical analyses were performed on a subgroup of age-matched $R^{+}A^{+}$ mice to confirm that the exacerbated heart hypertrophy observed with gestation was not a normal progression of the disease but rather an effect of pregnancy. Indeed, it demonstrated the gestational impact on heart hypertrophy was maintained when pregnant $R^{+}A^{+}$ mice (7.54 ± 0.29 mg) were compared to age-matched non-pregnant females (6.42 ± 0.20 mg) ($p \leq 0.001$). Heart hypertrophy was further assessed by echocardiography (Please see <http://hyper.ahajournals.org>). Furthermore, the EF and FS were calculated to evaluate LV performance. Although gestation had no effect on both parameters, $R^{+}A^{+}$ mice had a significantly lower EF as well as FS before and at the end of gestation compared to non-transgenic mice (Table 3). However, although we found no significant changes in systolic LV volume ($p = 0.09$), a significant difference was noted in diastolic volume compared to pre-gestation data (Table 3).

BNP and Nab1 gene expression was evaluated to confirm that cardiac hypertrophy observed in $R^{+}A^{+}$ was indeed pathological. We detected a significant effect of mice genotype, on both BNP and Nab1 as their expression was significantly higher in the LV from $R^{+}A^{+}$ mice both before and at the end of gestation compared to non-transgenic mice (Figure 4), supporting the pathological phenotype of cardiac hypertrophy.

Discussion

Our results clearly demonstrate that we have characterized, to our knowledge, the first model of SPE. Chronic hypertension being a major risk factor for development of the disease, R^+A^+ mice thus represent a clinical reality. In fact, it has been demonstrated that the incidence of PE increases to 15%- 25% in previously hypertensive women and is detected after *de novo* proteinuria with a rise in AP(22;32). As the mechanisms by which blood pressure increases during pregnancy in hypertensive women who develop SPE are still poorly understood, it is therefore very important to develop models that may mimic this specific category. In the present study, as in clinical SPE, hypertensive R^+A^+ mice manifested a significant elevation of MAP during gestation compared to non-transgenic animals and developed severe proteinuria which was not present at baseline. The fact that non-pregnant transgenic mice of similar ages or older did not develop proteinuria and that blood pressure decreased post-partum demonstrates that the phenomenon observed with gestation in these mice is not a simple progression of hypertension. Hence, proteinuria and aggravated hypertension are solely induced by pregnancy in these animals. Furthermore, this was accompanied by a significant increase in circulating sFlt-1 (when corrected for total placental weight) which has been suggested by many to be a marker of PE in women(33). In addition, the placentas were impaired, which resulted in a decreased pup and placental weight, indicating the presence of intrauterine growth restriction (IUGR) that is often associated with PE. They also manifested increased cardiac hypertrophy at the end of gestation accompanied with a decreased heart

function and a heightened BNP and Nab1 expression, indicating end organ damage. Hence, these mice truly seem to appropriately mimic the disease.

Many epidemiological studies have suggested a relation between alleles of the RAS and PE(34). For instance, women carrying specific polymorphisms of ACE(35) or angiotensinogen(36) genes had an increased risk of developing PE. Interestingly, these alleles have been shown to contribute to an increase in systemic RAS(37). Hence, although PE is typically associated with a decreased circulating RAS, our model is in line with these genetic association studies as $R^{+}A^{+}$ mice have elevated levels of circulating Ang-II(17).

Male $R^{+}A^{+}$ mice have already been well characterized(17;38-42). For instance, it has been shown that endothelial dysfunction is present and that increased oxidative stress in this model also contributed to the vascular dysfunction(39). We can thus hypothesise that endothelial dysfunction may also be present in the female $R^{+}A^{+}$, and may therefore contribute to the development of PE-like symptoms in this model.

Although mice developed severe proteinuria, we did not observe any signs of renal pathology. We can hypothesize that since these animals are exposed to increased levels of Ang II since birth, there may be some local adaptation of the renal RAS which may account for their resistance to develop renal damage. Also, as length of pregnancy is considerably shorter in mice than in human, it is possible that there is not sufficient amount of time to develop observable renal pathology.

In addition, placental pathology was apparent in samples obtained from R^+A^+ mice. More specifically, this was characterized by necrosis and loss of labyrinthine trophoblast structure. Interestingly, impaired placental perfusion and trophoblast invasion have been suggested to be implicated in the development of PE(5). We therefore suggest that the release of these substances by the poorly perfused placenta may have systemic influences and may contribute to the rise in MAP during gestation in the R^+A^+ mice. Moreover, placental weight is reduced in R^+A^+ mothers, demonstrating an impact of its pathology. Furthermore, pups from R^+A^+ litters were significantly smaller than those from non-transgenic mothers indicating that the placental pathology strongly impacted offspring growth, strengthening our hypothesis that these mice are an excellent model of SPE as IUGR is often present in this disease(43).

Angiogenic imbalance has been suggested by many to be implicated in the development of PE(44). It is known that sFlt-1 levels increase significantly during pregnancy(45), but it has been reported that these levels are higher in women suffering from PE. In addition, its injection in pregnant mice induces PE-like symptoms(46). In our model, we found that placental mRNA expression of sFlt-1 is higher in placentas compared to non-transgenic mice, and the circulating concentrations is increased when analysis are adjusted for total placental mass. We can therefore suggest that excessive sFlt-1 levels found in the plasma originates from pathological placentas as has been show in women. In line with these findings, we found a decrease in PlGF-2 protein from R^+A^+ placentas. Put together, these data strongly suggest the implication of

angiogenic imbalance as a possible mechanism involved in the development of PE. The use of total placental mass to adjust circulating sFlt-1 concentrations could be of great clinical interest, since some studies have shown that sFlt-1 concentrations were not associated significantly with PE(45;47) Hence, correcting for placental mass might improve the accuracy of this marker. Therefore, additional studies would need to be performed in women to evaluate the potential of this novel analysis.

In our model, the heart-to-body weight ratio was significantly enhanced compared to non-transgenic mice at baseline as has been observed previously in male $R^{+}A^{+}$ mice(39;40). This is exacerbated by pregnancy and is not just a result of the progression of the “normal” hypertension in this model as we did not observe this in females of comparable age. However, control mice also developed cardiac hypertrophy with gestation. Indeed, pregnancy is associated with physiological cardiac hypertrophy due to volume expansion that characterizes this state and is reversible after delivery(48). Hence, we suggest that the cardiac hypertrophy observed in $R^{+}A^{+}$ mice is pathological and may result from the increased pressure overload encountered by the heart during gestation although other mechanisms may be implicated such as different factors released by the hypoxic placenta(49). Conversely, increased heart-to-body weight ratio in non-transgenic mice during gestation is a normal physiological response. The results obtained by echocardiography supported this assumption as the EF and FS were only affected by the genotype, clearly demonstrating that heart function is only decreased in the $R^{+}A^{+}$ mice. As expected, CO was increased with pregnancy(50) and even though it tended to be lower in $R^{+}A^{+}$ mice, this difference did

not reach statistical significance. In addition, the pathological cardiac hypertrophy markers BNP(29;51) and Nabl were found to be increased only in $R^{+}A^{+}$ LV, further confirming our hypothesis.

In conclusion, our results confirm that $R^{+}A^{+}$ mice are an excellent model of SPE on chronic hypertension and, to our knowledge, it is the only characterized animal model of its kind. Since many characteristics of the pathology are observed, the model will be an important tool to study the molecular mechanisms underlying this frequently-reported disease of pregnancy.

Perspectives

Additional studies will be required to further investigate these animals to determine if other features of the disease, such as, liver dysfunction and low platelets, are also present. Moreover, it will be an interesting model to investigate the impact of SPE on the maternal heart, which is still a poorly understood phenotype. Further characterisation of our model could help target pathological mechanisms implicated in the disease to eventually prevent, treat and protect mothers and fetus.

Acknowledgments

We thank Dr. Louis Gaboury for his help in the evaluation of pathological symptoms present in placentas. We also thank Catherine Michel and Emmanuelle Courville for their excellent technical assistance in all the mice studies, as well as Julie Bérubé for laboratory technical assistance. We are indebted to Ovid Da Silva, Research Support Office, Research Centre, CHUM, for editorial revision of our manuscript.

Sources of funding

This research was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

Disclosures

None.

Placental pathology parameters												
Maternal												
genotype	N	Necrosis		Hyalinization		Microcal.		GCIL		LLTS		Total
		Mdn	75 %	Mdn	75 %	Mdn	75 %	Mdn	75 %	Mdn	75 %	Mdn %
R ⁻ A ⁻	52	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	2 3
R ⁺ A ⁺	31	1 [†]	2	2*	2	0	0	0	0.8	1*	2	5* 6

Table 1. Characterization of placental pathology.

The results are expressed as the median (Mdn.) and the 75th percentile of the score given in histology. * $p \leq 0.001$ and [†] $p \leq 0.01$, statistically different from the R⁻A⁻ genotype. GCIL, Giant cell island loss; LLTS, Loss of labyrinthine trophoblast structure; Mdn, Median; Microcal., Microcalcification.

Maternal genotype	N	Pup weight (mg)	Placental weight (mg)
R ⁻ A ⁻	59	806 ± 162	129 ± 27
R ⁺ A ⁺	54	682 ± 142*	102 ± 18*

Table 2. Pup and placental weight.

Values are expressed as means ± SE. * $p \leq 0.001$, statistically different from R⁻A⁻ genotype.

	Maternal genotype	N	LV vol systole (μ l)	LV vol diastole (μ l)	LV mass (mg)	EF (%)	FS (%)	SV (μ l)	CO (ml/min)
Before pregnancy	R ⁻ A ⁻	7	23.0 \pm 2.9	56.0 \pm 4.4	85.0 \pm 7.4	59.4 \pm 3.0	31.3 \pm 2.1	27.1 \pm 2.1	12.7 \pm 1.0
	R ⁺ A ⁺	9	29.1 \pm 3.5	57.5 \pm 4.8	112.3 \pm 4.6 γ	52.9 \pm 3.0 \parallel	30.1 \pm 2.7	25.7 \pm 2.4	11.6 \pm 1.3
End of pregnancy	R ⁻ A ⁻	7	33.9 \pm 4.5	71.0 \pm 2.3 \ddagger	100.3 \pm 7.0 \ddagger	57.2 \pm 4.0	30.3 \pm 2.6	33.9 \pm 2.4 *	15.7 \pm 1.4 \dagger
	R ⁺ A ⁺	9	32.3 \pm 1.3	66.7 \pm 1.5 \ddagger	140.4 \pm 2.0 \ddagger §	48.3 \pm 2.8 \parallel	22.9 \pm 0.8	32.6 \pm 1.9 *	14.2 \pm 0.7 \dagger

Table 3. Heart parameters calculated following echocardiography.

Values are expressed as means \pm SE. * $p \leq 0.001$, \dagger $p \leq 0.01$ and \ddagger $p \leq 0.05$, statistically different from the non-pregnant state and § $p \leq 0.001$ and \parallel $p \leq 0.05$, statistically different from the R⁻A⁻ genotype. LV, Left ventricle; vol, volume; EF, Ejection fraction; FS, Fractional shortening; SV, Stroke volume; CO, Cardiac output.

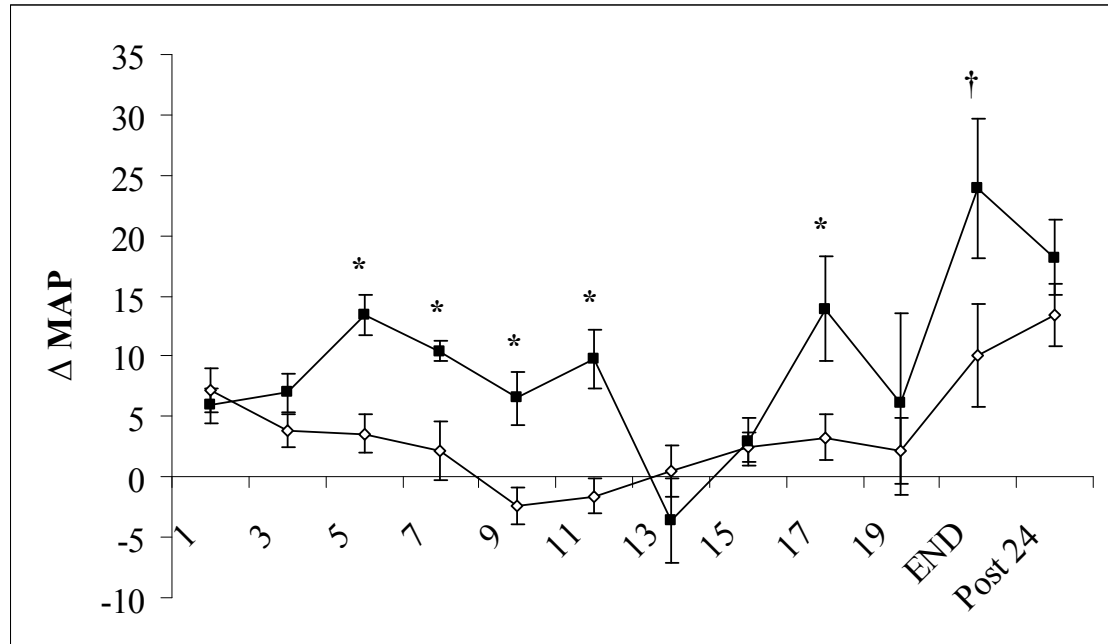


Figure 12. Changes in MAP during pregnancy.

MAP variation compared to baseline significantly increased in R^+A^+ mice (black squares, $n = 6$) at days 5, 7, 9, 11, 17 and at the end of pregnancy in comparison to R^-A^- mice (white diamonds, $n = 7$) as measured by telemetry. Values are expressed as means \pm SE. * $p \leq 0.05$ and † $p \leq 0.001$, statistically different from R^-A^- . END, end of gestation; 24 PP, 24 h post-partum.

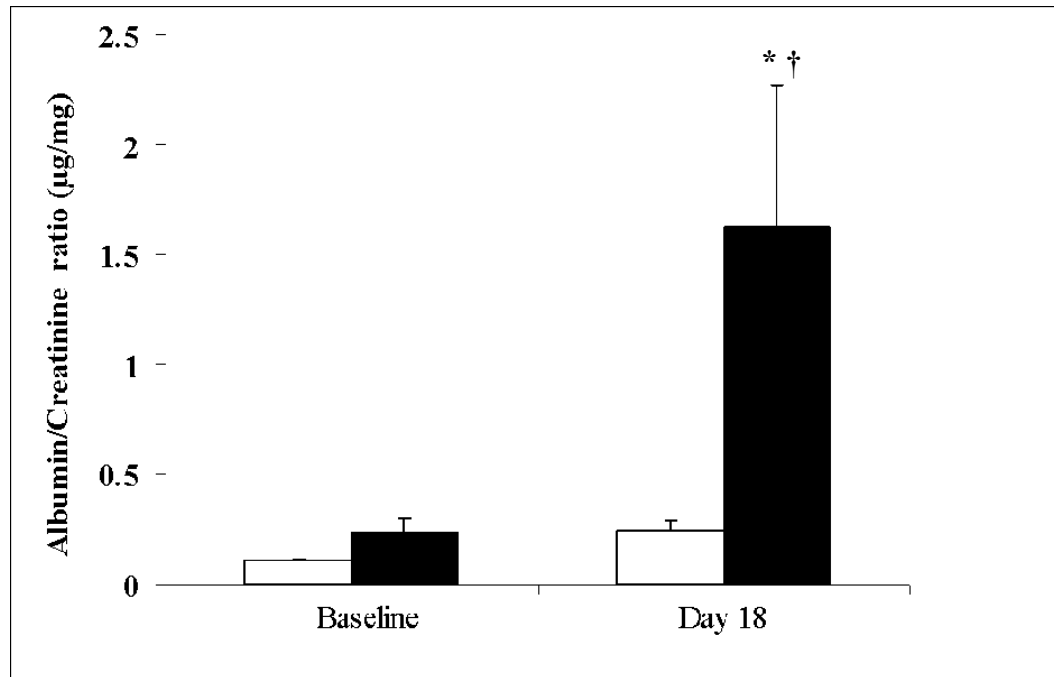


Figure 2. Changes in proteinuria during gestation.

Proteinuria was assessed by measuring the albumin/creatinine ratio in urine by ELISA. R⁺A⁺ mice (black, n = 6) show an elevated albumin/creatinine ratio at the end of gestation (Day 18) when compared to baseline. Furthermore, this was also significantly different from that observed in R⁻A⁻ mice (white, n = 9) at Day 18. Values are expressed as means \pm SE. * $p \leq 0.05$, statistically different from baseline and † $p \leq 0.001$, statistically different from R⁻A⁻.

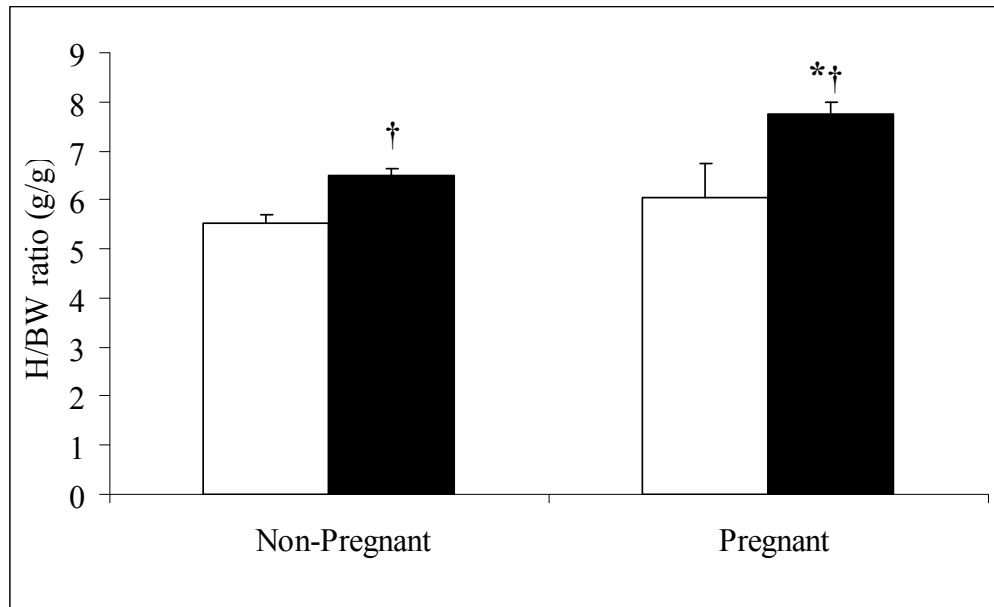


Figure 13. Heart-to-body weight ratio.

The Heart-to-body weight (H/BW) ratio was significantly higher in R⁺A⁺ mice (black, n = 9) compared to R⁻A⁻ mice (white, n = 9) before pregnancy, and the phenotype was exacerbated by gestation. Also, the H/BW ratio was significantly increased by pregnancy in R⁻A⁻ mothers. Values are expressed as means \pm SE. * $p \leq 0.05$, statistically different from non-pregnant mice and † $p \leq 0.001$, statistically different from R⁻A⁻ mice.

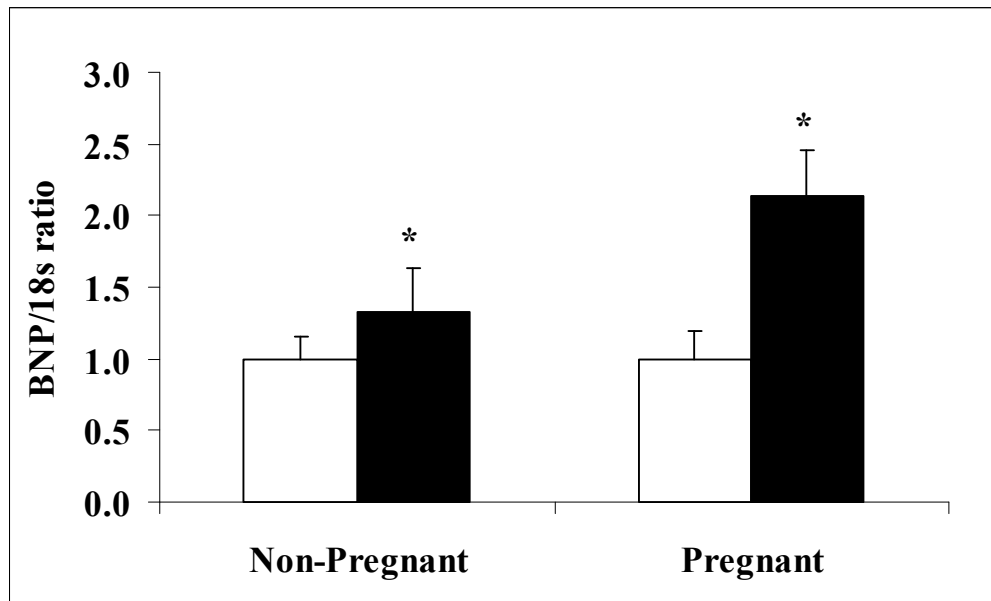
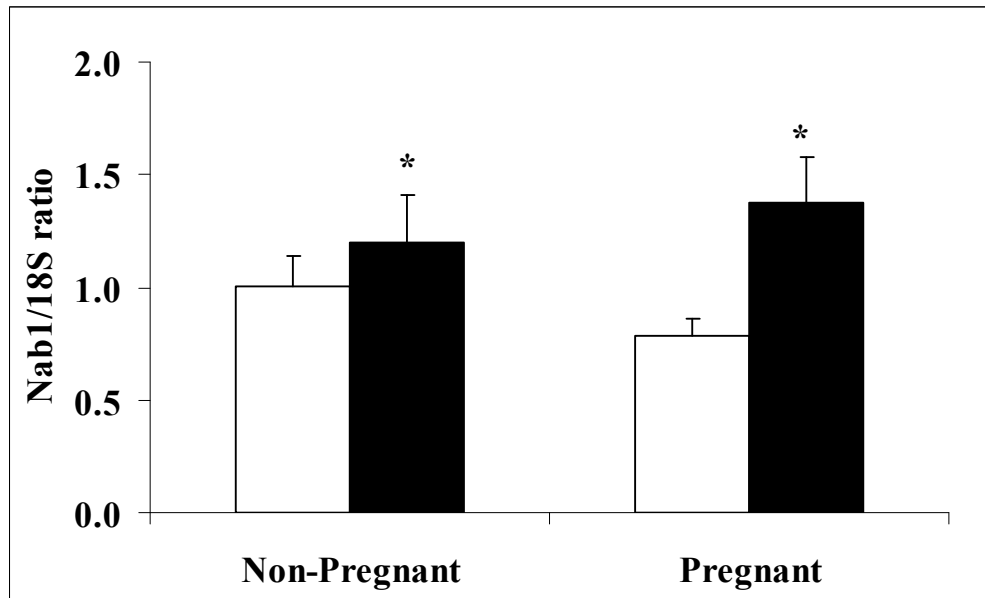
A**B**

Figure 14. BNP and Nab1 gene expression in the left ventricle.

BNP and Nab1 gene expression is significantly increased in $R^{+}A^{+}$ mice (black) compared to non-transgenic mice (white). Values are expressed as means \pm SE. * $p \leq 0.05$ and † $p \leq 0.01$ statistically different from $R^{-}A^{-}$ mice. For non-pregnant and pregnant Nab1 data, $n = 6$ for NT and $n = 5$ for $R^{+}A^{+}$ mice. For BNP, $n = 6$ for non-pregnant $R^{+}A^{+}$ and NT mice, $n = 5$ for $R^{+}A^{+}$ pregnant mice and $n = 4$ for NT pregnant mice.

References

- (1) Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; 365(9461):785-799.
- (2) Roberts JM, Lain KY. Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta* 2002; 23(5):359-372.
- (3) Brown MA, Lindheimer MD, de SM, Van AA, Moutquin JM. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertens Pregnancy* 2001; 20(1):IX-XIV.
- (4) Moutquin JM, Garner PR, Burrows RF, Rey E, Helewa ME, Lange IR, Rabkin SW. Report of the Canadian Hypertension Society Consensus Conference: 2. Nonpharmacologic management and prevention of hypertensive disorders in pregnancy. *CMAJ* 1997; 157(7):907-919.
- (5) Cross JC. The genetics of pre-eclampsia: a feto-placental or maternal problem? *Clin Genet* 2003; 64(2):96-103.
- (6) Kanasaki K, Palmsten K, Sugimoto H, Ahmad S, Hamano Y, Xie L, Parry S, Augustin HG, Gattone VH, Folkman J, Strauss JF, Kalluri R. Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature* 2008; 453(7198):1117-1121.
- (7) Gilbert JS, Babcock SA, Granger JP. Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression. *Hypertension* 2007; 50(6):1142-1147.
- (8) Shah DM. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288(4):F614-F625.

- (9) Gant NF, Daley GL, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J Clin Invest* 1973; 52(11):2682-2689.
- (10) Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest* 1999; 103(7):945-952.
- (11) Dechend R, Homuth V, Wallukat G, Kreuzer J, Park JK, Theuer J, Juepner A, Gulba DC, Mackman N, Haller H, Luft FC. AT(1) receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor. *Circulation* 2000; 101(20):2382-2387.
- (12) Rothmel A, Kurz R, Ruffer M, Weigel W, Jahnke HG, Sedello AK, Stepan H, Faber R, Schulze-Forster K, Robitzki AA. Cells on a chip--the use of electric properties for highly sensitive monitoring of blood-derived factors involved in angiotensin II type 1 receptor signalling. *Cell Physiol Biochem* 2005; 16(1-3):51-58.
- (13) Dechend R, Muller DN, Wallukat G, Homuth V, Krause M, Dudenhausen J, Luft FC. Activating auto-antibodies against the AT1 receptor in preeclampsia. *Autoimmun Rev* 2005; 4(1):61-65.
- (14) Cooper AC, Robinson G, Vinson GP, Cheung WT, Broughton PF. The localization and expression of the renin-angiotensin system in the human placenta throughout pregnancy. *Placenta* 1999; 20(5-6):467-474.
- (15) Takimoto E, Ishida J, Sugiyama F, Horiguchi H, Murakami K, Fukamizu A. Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science* 1996; 274(5289):995-998.

- (16) Bohlender J, Ganten D, Luft FC. Rats transgenic for human renin and human angiotensinogen as a model for gestational hypertension. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11(11):2056-2061.
- (17) Merrill DC, Thompson MW, Carney C, Schlager G, Robillard JE, Sigmund CD. Chronic hypertension and altered baroreflex responses in transgenic mice containing the human renin and human angiotensinogen genes. *J Clin Invest* 1996; 97:1047-1055.
- (18) Fukamizu A, Sugimura K, Takimoto E, Sugiyama F, Seo M-S, Takahashi S, Hatae T, Kajiwarra N, Yagami K, Murakami K. Chimeric renin-angiotensin system demonstrates sustained increase in blood pressure of transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes. *J Biol Chem* 1993; 268:11617-11621.
- (19) Sugiyama F. Development of genetically engineered mice with hypertension and hypotension. *Exp Anim* 1997; 46(3):171-182.
- (20) Ganten D, Wagner J, Zeh K, Koeller M, Bader M, Michel JB, Paul M, Zimmermann F, Ruf P, Hilgenfeld U, Ganten U, Kaling M, Bachmann S, Mullins JJ, Murakami K. Species-specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:7806-7810.
- (21) Lavoie JL, Bianco RA, Sakai K, Keen HL, Ryan MJ, Sigmund CD. Transgenic mice for studies of the renin-angiotensin system in hypertension. *Acta Physiol Scand* 2004; 181(4):571-577.
- (22) Podymow T, August P. Hypertension in pregnancy. *Adv Chronic Kidney Dis* 2007; 14(2):178-190.
- (23) Sigmund CD, Jones CA, Kane CM, Wu C, Lang JA, Gross KW. Regulated tissue- and cell-specific expression of the human renin gene in transgenic mice. *Circ Res* 1992; 70:1070-1079.

- (24) Yang G, Merrill DC, Thompson MW, Robillard JE, Sigmund CD. Functional expression of the human angiotensinogen gene in transgenic mice. *J Biol Chem* 1994; 269(51):32497-32502.
- (25) Falcao S, Bisotto S, Gutkowska J, Lavoie JL. Hyperhomocysteinemia is not sufficient to cause preeclampsia in an animal model: the importance of folate intake. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200(2):198-5.
- (26) Falcao S, Solomon C, Monat C, Berube J, Gutkowska J, Lavoie JL. Impact of diet and stress on the development of preeclampsia-like symptoms in p57kip2 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296(1):H119-H126.
- (27) Stoyanova E, Trudel M, Felfly H, Garcia D, Cloutier G. Characterization of circulatory disorders in beta-thalassemic mice by noninvasive ultrasound biomicroscopy. *Physiol Genomics* 2007; 29(1):84-90.
- (28) Buitrago M, Lorenz K, Maass AH, Oberdorf-Maass S, Keller U, Schmitteckert EM, Ivashchenko Y, Lohse MJ, Engelhardt S. The transcriptional repressor Nab1 is a specific regulator of pathological cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2005; 11(8):837-844.
- (29) Iso T, Arai M, Wada A, Kogure K, Suzuki T, Nagai R. Humoral factor(s) produced by pressure overload enhance cardiac hypertrophy and natriuretic peptide expression. *Am J Physiol* 1997; 273(1 Pt 2):H113-H118.
- (30) Jankowski M, Wang D, Mukaddam-Daher S, Gutkowska J. Pregnancy alters nitric oxide synthase and natriuretic peptide systems in the rat left ventricle. *J Endocrinol* 2005; 184(1):209-217.
- (31) Mutter WP, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res* 2008; 75(1):1-8.
- (32) Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(1):S1-S22.

- (33) Baumann MU, Bersinger NA, Surbek DV. Serum markers for predicting pre-eclampsia. *Mol Aspects Med* 2007; 28(2):227-244.
- (34) Mutze S, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Rath W. Genes and the preeclampsia syndrome. *J Perinat Med* 2008; 36(1):38-58.
- (35) Mello G, Parretti E, Gensini F, Sticchi E, Mecacci F, Scarselli G, Genuardi M, Abbate R, Fatini C. Maternal-fetal flow, negative events, and preeclampsia: role of ACE I/D polymorphism. *Hypertension* 2003; 41(4):932-937.
- (36) Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, Farrington PF, Ogasawara M, Suzumori K, Tomoda S, Berrebi S, Sasaki M, Corvol P, Lifton RP, Lalouel J-M. A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nature Genetics* 1993; 4:59-61.
- (37) Medica I, Kastrin A, Peterlin B. Genetic polymorphisms in vasoactive genes and preeclampsia: a meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007; 131(2):115-126.
- (38) Didion SP, Sigmund CD, Faraci FM. Impaired endothelial function in transgenic mice expressing both human renin and human angiotensinogen. *Stroke* 2000; 31(3):760-764.
- (39) Didion SP, Ryan MJ, Baumbach GL, Sigmund CD, Faraci FM. Superoxide contributes to vascular dysfunction in mice that express human renin and angiotensinogen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283(4):H1569-H1576.
- (40) Ryan MJ, Didion SP, Mathur S, Faraci FM, Sigmund CD. PPAR(γ) agonist rosiglitazone improves vascular function and lowers blood pressure in hypertensive transgenic mice. *Hypertension* 2004; 43(3):661-666.
- (41) Merrill DC, Granwehr BP, Davis DR, Sigmund CD. Use of transgenic and gene targeted mice to model the genetic basis of hypertensive disorders. *Proc Assoc Am Phys* 1997; 109:533-546.

- (42) Davisson RL, Yang G, Beltz TG, Cassell MD, Johnson AK, Sigmund CD. The brain renin-angiotensin system contributes to the hypertension in mice containing both the human renin and human angiotensinogen transgenes. *Circ Res* 1998; 83(10):1047-58.
- (43) Cross JC. Placental function in development and disease. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18(1-2):71-76.
- (44) Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA. Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med* 2008; 59:61-78.
- (45) Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 350(7):672-683.
- (46) Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; 111(5):649-658.
- (47) Solomon CG, Seely EW. Preeclampsia -- searching for the cause. *N Engl J Med* 2004; 350(7):641-642.
- (48) Eghbali M, Wang Y, Toro L, Stefani E. Heart hypertrophy during pregnancy: a better functioning heart? *Trends Cardiovasc Med* 2006; 16(8):285-291.
- (49) Maynard SE, Venkatesha S, Thadhani R, Karumanchi SA. Soluble Fms-like tyrosine kinase 1 and endothelial dysfunction in the pathogenesis of preeclampsia. *Pediatr Res* 2005; 57(5 Pt 2):1R-7R.
- (50) Chapman AB, Abraham WT, Zamudio S, Coffin C, Merouani A, Young D, Johnson A, Osorio F, Goldberg C, Moore LG, Dahms T, Schrier RW.

Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. *Kidney Int* 1998; 54(6):2056-2063.

- (51) Uhler MD, McKnight GS. Expression of cDNAs for two isoforms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 1987; 262(31):15202-15207.

ONLINE SUPPLEMENT

MICE OVEREXPRESSING BOTH HUMAN ANGIOTENSINOGEN AND HUMAN RENIN AS A MODEL OF SUPERIMPOSED PREECLAMPSIA ON CHRONIC HYPERTENSION

Stéphanie Falcao^{1,2}, Ekatherina Stoyanova^{2,3}, Guy Cloutier^{3,4}, Roch Listz Maurice^{3,4}, Jolanta Gutkowska^{1,5}, Julie L. Lavoie^{1,5}

¹Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada. ²Department of Biomedical Sciences, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. ³Laboratory of Biorheology and Medical Ultrasonics, CRCHUM, Montréal, Québec, Canada. ⁴Department of Radiology, Radio-Oncology and Nuclear Medicine, and Institute of Biomedical Engineering, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. ⁵Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Materials and Methods

Animals. Transgenic mice overexpression human renin and angiotensinogen (R^+A^+) were produced by breeding heterozygous human renin (Ren9 line) mice(1) with heterozygous human angiotensinogen (204/1 line) mice(2). Both these single transgenic lines, obtained from Dr. Curt D. Sigmund at the University of Iowa, were maintained in our animal facility by backcrossing with C57BL/6 mice (Charles River, St-Constant, QC, Canada). The mouse genotype was determined as described previously(1;2). The animals were kept on a 12-h light/dark cycle with water and standard laboratory chow (2018; Teklab Premier Laboratory Diets, Madison, WI) *ad libitum*. Mice in these experiments were 12-15 weeks of age, and were separated in 4 groups (Non-pregnant R^+A^+ and non-transgenic (R^-A^-); Pregnant R^+A^+ and R^-A^-). Their care met the standards set forth by the Canadian Council on Animal Care for the use of experimental animals. All procedures were approved by the University Animal Care Committee of the CHUM Research Centre.

Blood pressure measurement. Arterial pressure (AP) and heart rate (HR) were directly measured by telemetry with the TA11PA-C10 probes (Data Sciences International, St. Paul, MN). Probe catheter was inserted into the left carotid artery of female mice anesthetized by inhalation of isoflurane (induction at 4% and maintained at 2%) in oxygen(3;4). HR and AP were recorded for 3 consecutive days after 10 days of recovery post-surgery. Male mice were then placed in the cages for timed mating. Gestation was confirmed by the presence of a vaginal plug and was considered as day

1. Starting on this day, AP and HR were assessed every 2 days up to day 19 with measurements collected continuously until 24 h post-partum.

Proteinuria. Urine samples were collected before and on day 18 of gestation by briefly restraining the mice and directly retrieving urine in 1.5-ml tubes as done previously(3;4). This method avoids the unnecessary stress of placing the animals in metabolic cages for 24 hours. Indeed, it has been shown that mice of both sex present a significant rise in mean AP (MAP) and HR when placed in metabolic cages(5). The urine samples were kept frozen at -80°C until albumin and creatinine concentrations were quantitated with Albuwell and Creatinine companion mouse ELISA kits (Exocell, Philadelphia, PA), respectively, according to the manufacturer's protocol. Each sample was thawed and diluted 1:10 before quantitation in duplicate.

Tissue collection and histology. On day 18 of gestation, mice were anesthetized by intra-peritoneal injection of ketamine/xylazine (0.1ml/20g of mouse body weight of a 100mg/ml:20mg/ml solution). Blood was collected by heart puncture and placed in chilled 1.5 ml tubes containing EDTA (EMD, Gibbstown, NJ, USA). Plasma was separated by centrifugation and samples were kept frozen at -80°C until assayed. The pups were weighed, and their tails were cut and kept for genotyping. Kidneys, hearts, and placentas were all collected, weighed, and either flash-frozen in liquid nitrogen or placed overnight in 4% paraformaldehyde for fixation. The fixed tissues were washed 24 h after with phosphate buffer and then embedded in paraffin. Sections were obtained by cross-sectionally cutting the fixed tissues in a microtome.

To evaluate renal and placental morphology, the sections were stained with hematoxylin phloxine saffron (HPS) and evaluated by light microscopy. Embedding, sectioning and staining were achieved by the histology platform of the Research Institute in Immunology and Cancerology at the Université de Montréal.

Placental alterations were characterized by 5 criteria: necrosis, hyalinization, microcalcification, giant cell island loss and labyrinthine trophoblast structure loss as done previously(3;4). The latter two are respectively analogous to human extravillous cytotrophoblasts cells and chorionic villi structure(6). A score from 0 to 3 was assigned for each criterion: 0 for no change, 1 for mild, 2 for moderate, and 3 for severe alteration. All scores were then summed up for total evaluation of the placental pathology present. The investigator scoring the tissues was blinded to the genotype of the pups and mothers to avoid any bias.

Echocardiography. Transthoracic echocardiographic studies were performed before and at the end of pregnancy. The mice were anesthetized by inhalation of isoflurane 2-3% in oxygen, and then maintained on 2%. Their hearts were investigated as previously described(7) by high-resolution ultrasound biomicroscopy (Vevo660; Visualsonics, Toronto, ON, Canada) equipped with 25-55 MHz probes that allow tracings of time-varying M-mode dimensions of the left ventricle (LV). Positioning of the M-lines was guided by B-mode echocardiography. The parasternal long-axis view served to capture M-mode tracings through the anterior and posterior LV walls at the level of the papillary muscle. The M-mode sampling line was positioned

perpendicularly to the ascending aorta at the LV exit to record aortic diameter (AoD). Aortic flow velocity was measured in pulsed-wave Doppler mode, and the envelope of the Doppler tracing was delineated manually to compute the velocity time integral (VTI). LV mass was directly calculated by the apparatus's software. The ejection fraction (EF) was estimated by the formula: $EF = (LVEDV - LVESV) \times 100 / LVEDV$, where LVEDV and LVESV are respectively LV end-diastolic and end-systolic volumes. LV volumes were determined as $7 \times LVD^3 / (2.4 + LVD)$, where left ventricular diameter (LVD) is substituted by LVEDD for LV diastolic volume or LVESD for LV systolic volume. LV fractional shortening (FS) was given by $(LVEDD - LVESD) \times 100 / LVEDD$, whereas stroke volume (SV) was measured as: $SV = (AoD / 2)^2 \times \pi \times VTI$. SV times HR gives estimated cardiac output (CO).

Western Blot. Frozen placentas were lyophilized and subsequently homogenised in lysis buffer. Total protein content was measured in supernatants by standard Bradford assay. Samples containing 50µg of protein were loaded on 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel and separated by electrophoresis. Proteins were transferred on a nitrocellulose membrane (Whatman inc., Piscataway, NJ). Non-specific sites were blocked for one hour at room temperature in 5% non-fat milk in SuperBlock buffer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Membrane was then incubated with the primary monoclonal antibody anti-PlGF-2 (1:100, 1:10 Superblock in 0.2% Tween 20 (Fischer Scientific, Ottawa, ON, Canada) in TBS) (Abcam, Cambridge, MA) overnight at 4°C. Secondary antibody, anti-rat conjugated with horseradish peroxidase (1:1000, 1:10 Superblock in 0.2% Tween 20 (Fischer

Scientific) in TBS) (Santa Cruz Biothecnology, Santa Cruz, CA) was applied for 1h at room temperature. Bands were revealed using the ECL West Pico kit (Pierce, Rockford, IL). Total protein was subsequently measured by staining of the membrane with Amido Black (Sigma, St-Louis, MO). PlGF-2 signal was normalized to total protein for each band.

Real-time PCR. Brain natriuretic peptide (BNP) and NGF1-A-binding protein (Nab1) were both amplified in left ventricles, while fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) was amplified in placentas. BNP and Nab1 are both reported to be specific markers of pathological cardiac hypertrophy, as they are markedly increased in this condition, whereas no differences are detected in physiological hypertrophy such as exercise training(8;9). Thus, their expression was measured to differentiate physiological heart hypertrophy in pregnancy and hypertension-derived pathological cardiac remodelling. Total RNA was extracted from frozen samples using Trizol (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol. To remove genomic DNA, RNA samples were incubated with 2 U deoxyribonuclease I (DNase I; Invitrogen)/ug RNA for 30 min at 37°C. Single-stranded cDNA was synthesized by reverse-transcriptase reaction with Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) (Invitrogen). PCR was undertaken in the iCycler IQ Real Time PCR detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), using SYBR® green chemistry(10). In brief, 2 µl of diluted cDNA was added to an 18 µl reaction mixture containing 1X iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) and 200 nM forward and reverse primers (Invitrogen). The following primer sets were employed to generate amplicons: Nab1

strand (s): CAGGCCGGGTATGAGAGG; Nab1 anti-strand (as): GCTGTCGGTTCTGCACACT; BNP (s): CTGAAGGTGCTGTCCCA GAT; BNP (as): GTTCTTTTGTGAGGCCTTGG; sFlt-1 (s): AGGTGAGCACTGCGGCA ; sFlt-1 (as): ATGAGTCCTTTAATGTTTGA; 18S Universal 18S internal standards (#1718; Ambion, Streetsville, ON, Canada). Each sample was run and analyzed in duplicate. mRNA levels were expressed as values relative to 18S mRNA.

Drugs. The following drugs were purchased for mouse anesthesia: ketamine (Bimeda-MTC, Cambridge, ON, Canada), xylazine (Bayer, Toronto, ON, Canada) and isoflurane (Abbott, St-Laurent, QC, Canada).

Results

LVID was significantly smaller at systole in $R^{+}A^{+}$ mice, both before and at the end of gestation, as their LVPW was significantly thicker when compared to non-transgenic mice (Table S5). The IVS thickness remained similar in all animals (Table S5). LV mass followed the same pattern as the total heart-to-body weight ratio.

Table S1. Maternal body weight

Maternal genotype	N	Pre-gestational BW (mg)	End of gestation BW (mg)
R ⁻ A ⁻	10	20.69 ± 1.17	33.59 ± 3.26
R ⁺ A ⁺	9	22.76 ± 2.11	34.67 ± 4.43

BW, body weight

Table S2. Heart parameters calculated following echocardiography.

	Maternal genotype	N	LV ID systole (mm)	LV ID diastole (mm)	LV PW systole (mm)	LV PW diastole (mm)	IVS systole (mm)	IVS diastole (mm)
Before pregnancy	R ⁻ A ⁻	7	2.50 ± 0.14	3.63 ± 0.12	1.10 ± 0.09	0.77 ± 0.06	0.89 ± 0.11	1.32 ± 0.14
	R ⁺ A ⁺	9	2.63 ± 0.14†	3.71 ± 0.10	1.26 ± 0.04†	0.91 ± 0.03*	0.98 ± 0.04	1.47 ± 0.09
End of pregnancy	R ⁻ A ⁻	7	2.80 ± 0.13	4.01 ± 0.06‡	1.02 ± 0.06	0.73 ± 0.04	0.93 ± 0.08	1.36 ± 0.11
	R ⁺ A ⁺	9	2.97 ± 0.11†	3.89 ± 0.12‡	1.28 ± 0.06†	1.05 ± 0.04*	1.15 ± 0.05	1.56 ± 0.06

Values are expressed as means ± SE. * p≤0.001 and † p≤0.05 , statistically different from the R-A- genotype, and ‡ p≤0.05, statistically different from the non-pregnant state. LVID, Left ventricular internal diameter; LVPW, Left ventricular posterior wall thickness; IVS, Interventricular septum.

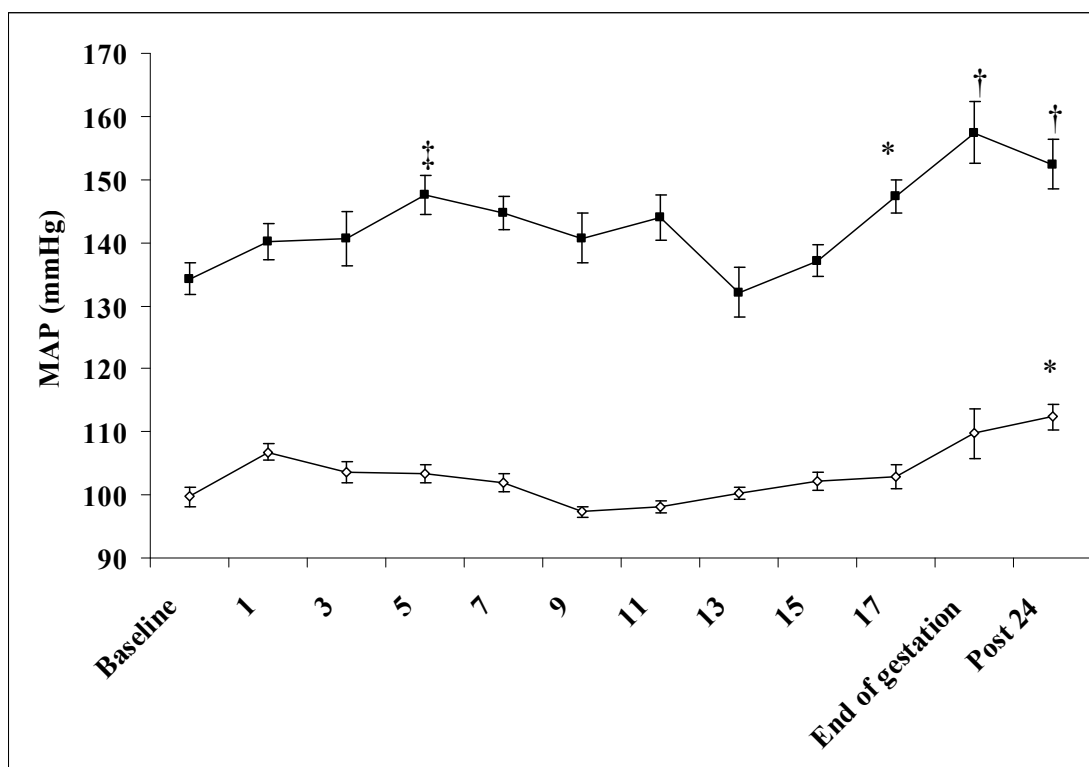
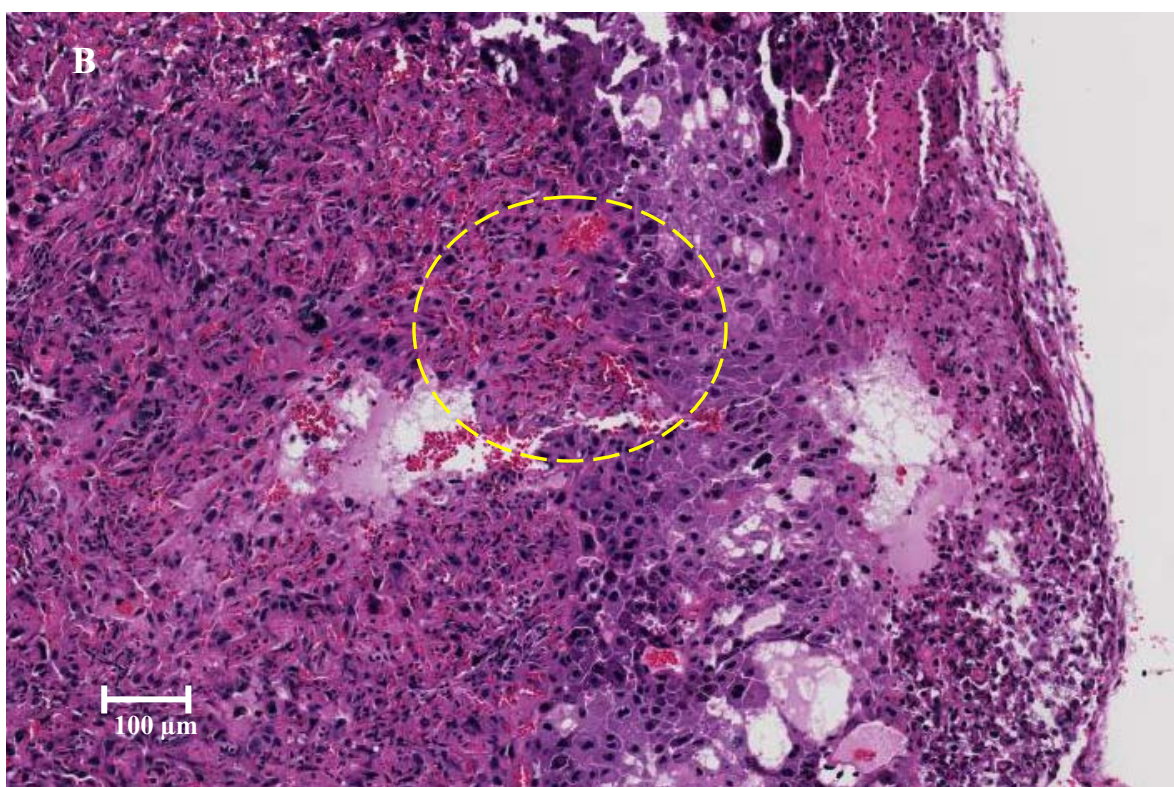
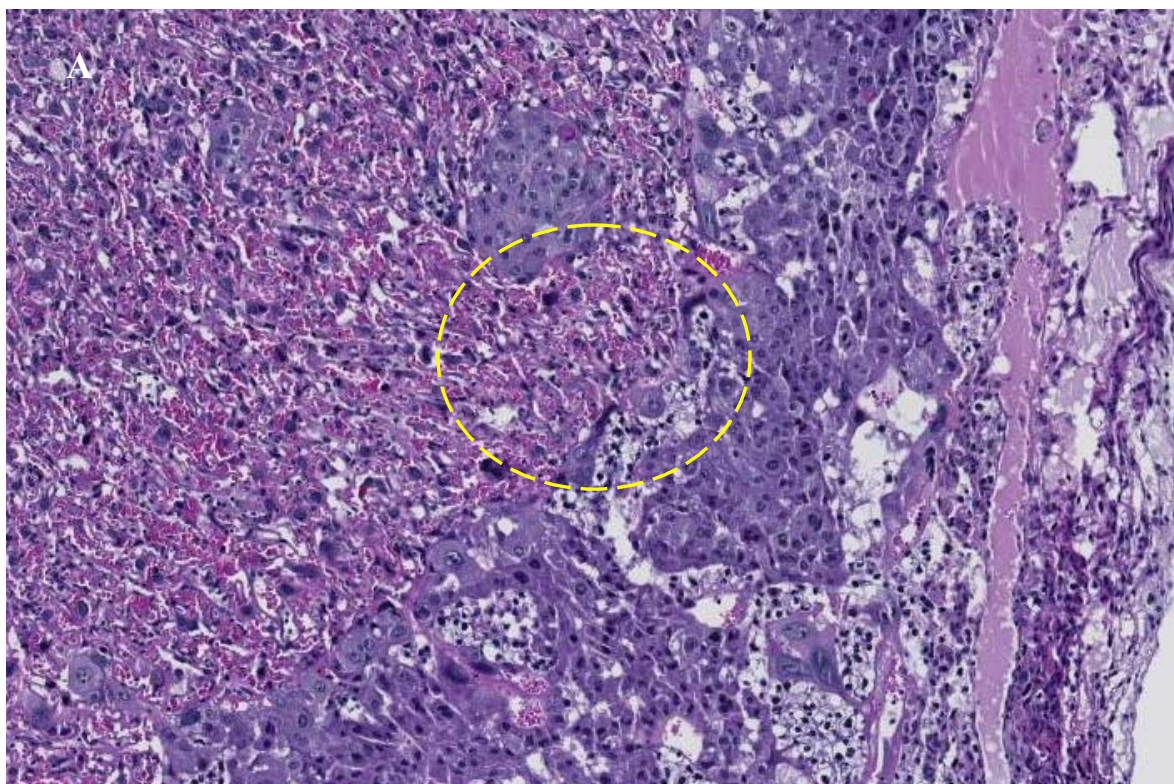


Figure S15. MAP throughout pregnancy.

Average MAP during pregnancy significantly increased in R^+A^+ mice (black squares, $n = 6$) at days 5, 17, at the end of pregnancy and 24PP postpartum in comparison to their baseline as measured by telemetry. In R^-A^- mice (white diamonds, $n = 7$), it was also significantly increased at 24h postpartum in comparison to their baseline. Values are expressed as means \pm SE. * $p \leq 0.05$ and $\dagger p \leq 0.001$, and $\ddagger p \leq 0.01$ statistically different from baseline. END, end of gestation; Post 24, 24 h post-partum.



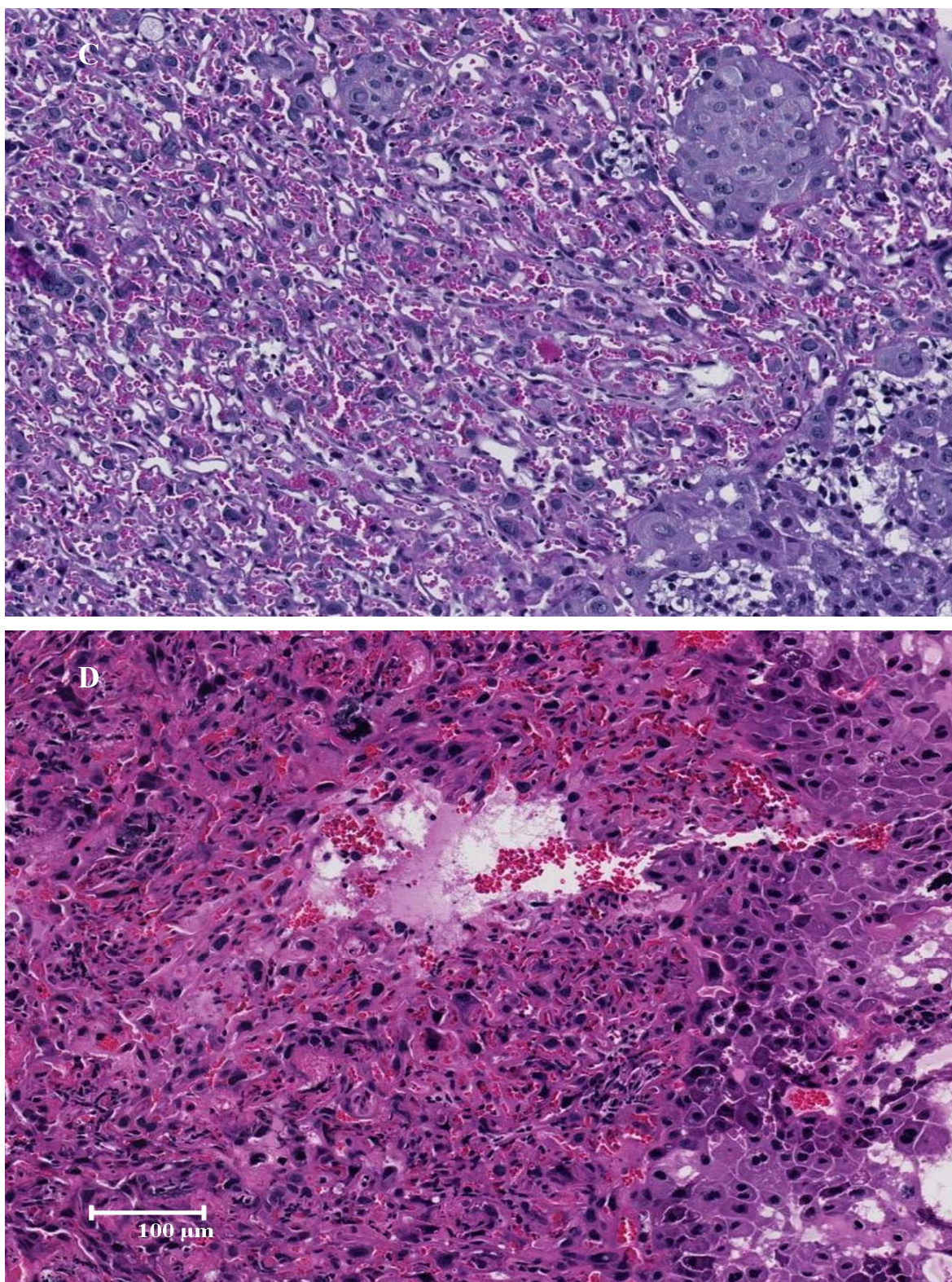


Figure16. Placental histology.

These images demonstrate typical HPS staining in placentas from A) R^-A^- and B) R^+A^+ mothers. C) and D) represent a greater magnification of the encircled region of the previous images in the same order. Placental pathology can be clearly observed in the R^+A^+ placenta as loss of labyrinthine trophoblast structure on this panel. This is characterized by a much more compact appearance of the labyrinth layer as compared to R^-A^- where cells are well defined and dispersed as is delineated by a yellow circle on both panels. HPS, hematoxylin phloxine saffron.

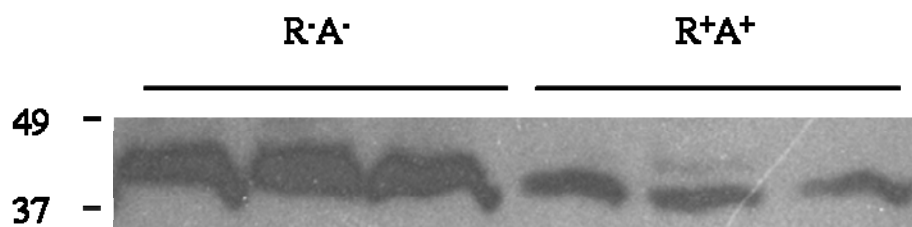


Figure S3. PIGF-2 Western Blot.

This image is a representative Western Blot of PIGF-2 on placentas from R^-A^- and R^+A^+ mothers. Signal was observed at 38 kDa

References

- (1) Sigmund CD, Jones CA, Kane CM, Wu C, Lang JA, Gross KW. Regulated tissue- and cell-specific expression of the human renin gene in transgenic mice. *Circ Res* 1992; 70:1070-1079.
- (2) Yang G, Merrill DC, Thompson MW, Robillard JE, Sigmund CD. Functional expression of the human angiotensinogen gene in transgenic mice. *J Biol Chem* 1994; 269(51):32497-32502.
- (3) Falcao S, Solomon C, Monat C, Berube J, Gutkowska J, Lavoie JL. Impact of diet and stress on the development of preeclampsia-like symptoms in p57kip2 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296(1):H119-H126.
- (4) Falcao S, Bisotto S, Gutkowska J, Lavoie JL. Hyperhomocysteinemia is not sufficient to cause preeclampsia in an animal model: the importance of folate intake. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200(2):198.e1-198.e5.
- (5) Hoppe CC, Moritz KM, Fitzgerald SM, Bertram JF, Evans RG. Transient hypertension and sustained tachycardia in mice housed individually in metabolism cages. *Physiol Res* 2009; 58(1):69-75.
- (6) Cross JC. The genetics of pre-eclampsia: a feto-placental or maternal problem? *Clin Genet* 2003; 64(2):96-103.
- (7) Stoyanova E, Trudel M, Felfly H, Garcia D, Cloutier G. Characterization of circulatory disorders in beta-thalassemic mice by noninvasive ultrasound biomicroscopy. *Physiol Genomics* 2007; 29(1):84-90.
- (8) Buitrago M, Lorenz K, Maass AH, Oberdorf-Maass S, Keller U, Schmitteckert EM, Ivashchenko Y, Lohse MJ, Engelhardt S. The transcriptional repressor Nab1 is a specific regulator of pathological cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2005; 11(8):837-844.

- (9) Iso T, Arai M, Wada A, Kogure K, Suzuki T, Nagai R. Humoral factor(s) produced by pressure overload enhance cardiac hypertrophy and natriuretic peptide expression. *Am J Physiol* 1997; 273(1 Pt 2):H113-H118.
- (10) Jankowski M, Wang D, Mukaddam-Daher S, Gutkowska J. Pregnancy alters nitric oxide synthase and natriuretic peptide systems in the rat left ventricle. *J Endocrinol* 2005; 184(1):209-217.

Chapitre 10 – Exercise training can attenuate preeclampsia-like symptoms in an animal model

EXERCISE TRAINING CAN ATTENUATE PREECLAMPSIA-LIKE SYMPTOMS IN AN ANIMAL MODEL.

Stéphanie Falcao^{a, b}, Sandra Bisotto^a, Catherine Michel^a, Andrée-Anne Lacasse^c, Cathy Vaillancourt^c, Jolanta Gutkowska^{d, e} and Julie L. Lavoie^{a, e}

^aResearch Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) – Technopôle Angus, Montreal, Quebec, Canada, ^bDepartment of Biomedical Sciences, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada ^cINRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Quebec, Canada, ^dCRCHUM – Hôtel-Dieu, ^eDepartment of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Short title: Exercise training attenuates preeclampsia

Funding: Canadian Institutes of Health Research and Fonds de la recherche en santé du Québec

Conflict of interest: NONE

Word count: 5439 words

Abstract

OBJECTIVE: Exercise training benefits on general health have been widely investigated and used as an alternative treatment in different pathological conditions. Since preeclampsia is a severe pregnancy-associated pathology for which no treatment is available, our aim was to investigate the protective role of exercise training on pregnancy outcome using a mouse model of the disease. **METHODS:** To do so, we used transgenic female mice overexpressing human angiotensinogen, which develop preeclampsia when they are mated with human renin-overexpressing males. Females were placed in exercise cages 4 weeks prior to mating, and remained in these throughout gestation. Blood pressure was measured by telemetry, and proteinuria was quantified by ELISA. Placentas were assessed by histology and immunohistochemistry while vascular endothelial growth factor was measured by real-time PCR and immunoblot. Endothelial function was assessed in isolated mesenteric arteries. **RESULTS:** Conversely to sedentary transgenic females, mean arterial pressure was no longer different from non-transgenic mice at the end of gestation. Proteinuria, placental pathology and cardiac hypertrophy normally observed in sedentary transgenic mice were absent in trained mice. Impaired vascular reactivity was also significantly ameliorated. Furthermore, placentas from trained transgenic mice presented with normalized levels of vascular endothelial growth factor. **CONCLUSIONS:** To our knowledge, we are the first to clearly demonstrate that exercise training both before and during gestation can reduce preeclampsia symptoms in a mouse model of the disease. Consequently, women at risk for this pathology could benefit from exercise training to protect themselves and their future fetuses from this disease.

Keywords: exercise training, preeclampsia, mouse model, VEGF, placental markers

Condensed abstract

Preeclampsia is a severe pregnancy-associated pathology. Our aim was to investigate the protective role of exercise training on preeclampsia symptoms in a mouse model. Females were placed in exercise cages 4 weeks prior to mating, and remained there throughout gestation. Conversely to sedentary transgenic females, mean arterial pressure was no longer different from non-transgenic mice at the end of gestation. Proteinuria, placental pathology and cardiac hypertrophy normally observed in sedentary transgenic mice were absent in trained mice. Impaired vascular reactivity was also significantly ameliorated. Exercise training can thus reduce preeclampsia symptoms in a mouse model of the disease.

Introduction

It is now well-recognized that physical activity has a beneficial impact on general public health. More specifically, positive effects have been reported on many chronic and cardiovascular diseases, such as obesity, type 2 diabetes, chronic hypertension, and even certain types of cancer[39]. Furthermore, it has also been suggested that physical activity may be beneficial to both mother and fetus during pregnancy by reducing the risk of gestational hypertension, preeclampsia (PE) and gestational diabetes mellitus[52] as well as improving placental development[6]. However, the number of studies is limited, and they are mostly not randomized[23]. Furthermore, the criteria defining physical activity intensity fluctuate significantly from one study to another, and the number of women is often too low to draw reliable conclusions[23, 33]. Even if physical activity is already recommended by the American College of Gynecology and Obstetrics for healthy pregnancies[1], there is still a certain apprehension regarding the prescription of exercise training (ET) as a preventive treatment for women at risk[9].

Reducing the risk of PE with ET would represent an important progress since, to date, no treatments are available for the pathology. Indeed, this disease, which affects 5-7% of all pregnancies, is the principal cause of maternal and fetal morbidity[45]. PE is diagnosed by the onset of hypertension and proteinuria after 20 weeks of gestation and can deteriorate to maternal end organ damage as well as fetal and even maternal death[36]. As symptoms resolve completely after delivery[41], it remains the only treatment for affected women and, therefore, is often associated with preterm delivery[36]. Factors

implicated in the development of PE are thought to be of various origins, believed to be a complex combination of genetic and environmental causes, although molecular mechanisms underlying the pathology are still poorly understood[7, 28, 45]. Consequently, pharmacological management of PE remains very complicated, especially since many anti-hypertensive drugs are teratogenic[35]. ET is therefore an attractive means to protect mothers and fetuses.

Even though many cardiovascular benefits are associated with ET, it is still a popular belief that it may be deleterious to mothers and fetuses during pregnancy[9]. Indeed, it was suggested in some studies that physical activity might have adverse effects on pregnancy, such as decreases in fetal weight[4]. However, as well reviewed by Clapp in 2006[6], many studies in the past decades have observed the exact opposite. Moreover, it was shown that if a decrease in birth weight was observed, it was entirely due to a decrease in fat mass and not a result of a reduction in either skeletal or brain growth, nor in lean body mass[26]. Furthermore, it was proposed that insufficient caloric intake by the mother was involved in the decreased fetal weight observed in these studies. Moreover, it was demonstrated that ET improved placental perfusion by increasing villous area and placental vascular volume[26].

Rodent models mimicking PE have been characterized and are believed to be a good tool to study the disease. Indeed, mice gestation is similar to human pregnancy in many ways[42], and their genetic backgrounds, as well as their environment, can be managed without difficulty. Of particular interest, the BP response to pregnancy in mice is similar

to that observed in humans[11, 54]. In addition, mice and humans have similar hemochorial placentation, for which alterations are crucial in the development of the disease[32]. Transgenic female mice overexpressing human angiotensinogen (hAng) spontaneously develop PE-like symptoms when they are mated with human renin (hRN)-overexpressing males [47]. Given that Ang cleavage by renin is species-specific, both single transgenic females and males are normotensive[19, 55]. However, as a consequence of this mating, there is overexpression of the utero-placental renin-angiotensin system and release of hRN by the placenta into the mother's circulation, which is thought to cause the PE-like symptoms in this model[47, 48]. Thus, these mice show an elevation in blood pressure during gestation, which resolves after delivery. In this model, transient hypertension is accompanied by proteinuria, cardiac hypertrophy and placental pathology, all distinctive symptoms of PE[47]. It was also reported recently that fetoplacental vascular maturation and uteroplacental tissue remodelling are impaired in these mice, leading to fetal hypoxia and intrauterine growth restriction[20].

The impact of physical activity on human health and animal models has been widely studied in the past decade, but, to date, none have determined a cause-effect relationship between ET and the reduction of PE risk. Furthermore, the mechanisms by which physical activity may reduce PE symptoms have yet to be investigated. Hence, the aim of this study is to evaluate if ET will diminish PE symptoms in transgenic mice (female hAng X male hRN) that develop the disease when sedentary. Furthermore, given that endothelial dysfunction, which is often implicated in PE[38], has not yet been investigated in this model, this was also evaluated in our study.

Methods

Animals. hAng transgenic mice (204/1 line) were originally obtained from Dr. Curt D. Sigmund[55] of the University of Iowa, and, hRN transgenic mice (hRN8-12 line) were acquired from Riken BRC (Tsukuba, Japan) with the authorization of Dr. A. Fukamizu[18]. Both transgenic lines were maintained in our animal facility by backcrossing with C57BL/6 mice (Charles River, St-Constant, QC, Canada). Mouse genotype was determined as described previously[46, 55]. The animals were kept on a 12-h light/dark cycle with water and standard laboratory chow (2018; Teklab Premier Laboratory Diets, Madison, WI) *ad libitum*. The mice in these experiments were 12-15 weeks of age, and their care met the standards set forth by the Canadian Council on Animal Care for experimental animals. All procedures were approved by the University Animal Care Committee of the CHUM Research Centre.

Similarly to what had been previously published [47], hAng females were bred with hRN male mice to produce PE-like symptoms in the females. Mice used for control purposes were all non-transgenic (NT) littermates.

ET. The mice were placed in cages with access to a running wheel 1 month prior to pregnancy, and remained in these throughout gestation. Indeed, studies have shown a significant increase in aerobic capacity with only 3 weeks of ET in a running wheel[10, 22]. ET was measured as each cage was connected to a computer and, thus, the number

of revolutions was counted to confirm training status (Compte-tour5, Aquila, Boucherville, Qc, Canada). Running data were compiled and analysed.

Arterial pressure measurement. Arterial pressure (AP) and heart rate (HR) were directly quantified in the carotid artery by telemetry with TA11PA-C10 probes (Data Sciences International, St. Paul, MN)[15, 16]. Probe catheter was inserted into the left carotid artery of female mice anesthetized by inhalation of isoflurane (induction at 4% and maintained at 2%) in oxygen. After 7-10 days of recovery post-surgery, HR and AP were recorded for 3 consecutive days. The mice were then put in cages with access to an exercise wheel for 1 month. Animals that were kept sedentary were placed in the same type of cages but the exercise wheel was locked to prevent activity. After this period, male mice were introduced in the cages for timed-mating. Gestation was confirmed by the presence of a vaginal plug, which was considered as day 1 of pregnancy. Starting on this day, AP and HR were assessed every 2 days up to day 19, and then measurements were collected continuously until 48 h post-partum. Given that mice give birth between day 19 and 21 of gestation, the day preceding delivery was considered as “end of gestation” to allow for adequate comparison.

Proteinuria. Urine samples were collected before and on day 18 of gestation by briefly restraining the mice and directly retrieving urine in 1.5-ml tubes as done previously[15, 16]. This method avoids the unnecessary stress of placing the animals in metabolic cages for 24 h. Indeed, it has been shown that mice of both sex present a significant rise in mean AP (MAP) and HR when placed in metabolic cages[24]. The urine samples were

kept frozen at -80°C until albumin and creatinine concentrations were quantitated with Albuwell and Creatinine companion mouse ELISA kits (Exocell, Philadelphia, PA), respectively, according to the manufacturer's protocol. Each sample was thawed and diluted 1:10 before quantitation in duplicate.

Tissue collection and histology. In a separate time matings, on day 18 of gestation, mice were anesthetized with ketamine/xylazine (0.1 ml/20 g of mouse body weight of a 100 mg/ml:20 mg/ml solution). Blood was collected by heart puncture and placed in chilled 1.5 ml tubes containing EDTA (EMD, Gibbstown, NJ), or collected in microhematocrit tubes that were subsequently centrifuged to measure hematocrit values. Plasma was separated by centrifugation and samples were kept frozen at -80°C until assayed. All pups were weighed and their tails were snipped and kept for genotyping. Kidneys, hearts, and placentas were collected, weighed, and snap frozen in liquid nitrogen or fixed overnight in 4% paraformaldehyde. The fixed tissues were washed after 24 h with phosphate buffered saline and embedded in paraffin. Sections were obtained by cross-sectional cutting in a microtome. To evaluate renal and placental morphology, sections were stained with hematoxylin-phloxine-saffran and evaluated by light microscopy. Embedding, sectioning and staining were undertaken by the histology platform of the Research Institute in Immunology and Cancerology at the Université de Montréal.

Placental alterations were characterized by 5 criteria: necrosis, hyalinization, microcalcification, cytotrophoblastic island loss and labyrinthine trophoblast structure loss, as done previously[15, 16]. The latter two are respectively analogous to human

extravillous cytotrophoblasts cells and chorionic villous trophoblast[7]. A score from 0 to 3 was assigned for each criterion: 0 for no change, 1 for mild, 2 for moderate, and 3 for severe alteration. All scores were summed to evaluate the overall placental pathology present. The investigator scoring the tissues was blinded to the genotype of the pups and mothers to avoid any bias.

Immunohistochemistry. Immunochemical analysis was performed on at least 3 different placentas obtained from 3 different mice/group, thus 9 placentas/group. Paraffin-embedded tissue was sectioned at 4 μ m and deparaffinised in citrisolv (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Antigen retrieval was carried out by boiling section in sodium citrate buffer (10 mM, pH 6.0) for 3 min. Immunostaining was performed with Catalyzed Signal Amplification (CSA) System (Dako, Carpinteria, CA) according to the manufacturer's instructions with the following modifications. Peroxidase activity was blocked for 15 min at room temperature with peroxidase block solution. Samples were rinsed in 3 baths of 3 min in TBS-T (0.05 M tris-HCL, 0.3 M NaCl, 0.1% tween, pH 7.6). They were then incubated with endogenous avidin and biotin blocking solution (Thermo Scientific, Ottawa, ON, Canada) for 15 minutes at room temperature. Non-specific antigen binding was blocked by incubation in protein block solution for 30 min at room temperature. The sections were incubated overnight at 4°C with specific immunohistochemical primary antibodies diluted in TBS with 1% bovine serum albumin at the following concentrations, anti-pan-cytokeratin (1:800; ab9377, Abcam, Cambridge, MA) and anti-Ki67 (1:1600; ab66155, Abcam). Tissue sections were incubated with biotin-conjugated secondary antibody (1:5000, donkey anti-rabbit; AP182B, Chemicon

international, Millipore, Billerica, MA) solution for 1 h at room temperature. Primary antibodies were omitted in the negative control (Figure 8). Samples were incubated 15 min with streptavidin-biotin complex and then with amplification reagent for 15 min at room temperature. Another incubation was done with a streptavidin-peroxidase for 15 min. They were stained with substrate-chromogen solution for 4 min and counterstained with Mayer's hematoxylin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) blue in 0.3% ammonia water. Sections were viewed and photographed with a Leitz Diaplan microscope equipped with a Nikon CoolPix 990 camera (Nikon Instruments, Melville, NY).

Real-time PCR. Total RNA was extracted from placentas with Trizol (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol. To remove genomic DNA, RNA samples were incubated with 2 U deoxyribonuclease I (DNase I; Invitrogen)/ug RNA for 30 min at 37°C. Single-stranded cDNA was synthesized by reaction with SuperScriptII Reverse Transcriptase (Invitrogen). The real-time PCR final volume of 25 µl contained 0.3 µmol/l of forward (F) and reverse (R) primers for vascular endothelial growth factor (VEGF: F (5'-CAGGCTGCTGTAACGATGAA-3'); R (5'-GCATTCACATCTGCTGTGCT-3')) and 18s (F (5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'); R (5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3')) as well as 5 µl of diluted single-stranded cDNA template in FastStart SYBR Green Master PCR mix from (Roche, Laval, QC, Canada) (1X final). Each sample was analyzed in duplicate. mRNA levels are expressed as values relative to 18s mRNA.

Western Blot. Frozen placentas were lyophilized and subsequently homogenised in lysis buffer. Total protein content was measured in supernatants by standard Bradford assay. Samples containing 50 µg of protein were loaded on 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel and separated by electrophoresis at 120V. Proteins were transferred on a nitrocellulose membrane (Whatman inc., Piscataway, NJ) at 4°C for 1h30 at 100V. Non-specific sites were blocked for one hour at room temperature in 5% non-fat milk. Membrane was then incubated with the primary polyclonal antibody anti-VEGF (1:1000, (Abcam) overnight at 4°C. Secondary antibody, anti-rabbit conjugated with horseradish peroxidase (1:5000) (Santa Cruz Biothecnology, Santa Cruz, CA) was applied for 1h at room temperature. Bands were revealed using the ECL West Pico kit (Pierce, Rockford, IL). Total protein was subsequently measured by staining of the membrane with Amido Black (Sigma, St-Louis, MO, USA). VEGF signal was normalized to total protein for each band.

Vessel studies. At 18 days of gestation, mesenteric resistance arteries were isolated and excised to assess vessel reactivity as described previously[15, 16]. Briefly, the vessels were double-cannulated between 2 glass micropipettes in a vessel chamber. They were exposed to 30 mmHg intraluminal resting pressurization and placed in 37°C oxygenated Krebs solution (118.6 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 25.1 mM NaHCO₃, 26 µM EDTA, 10.1 mM glucose, 2.5 mM CaCl₂). Vessel reactivity was assessed according to 3 protocols and dose-response curves were charted: 1. Norepinephrine (NE, 10⁻⁹ to 10⁻⁵ M), 2. Acetylcholine (Ach, 10⁻⁹ to 10⁻⁴ M) and 3. Sodium nitroprusside (SNP, 10⁻⁹ to 10⁻⁴ M). All drugs were administered extraluminally,

and each protocol was separated by a 30-min wash-out period to allow vessel diameter to return to baseline. Prior to the vasodilatation measurements, the arteries were precontracted to about 70% of their equilibration diameter with an appropriate amount of NE.

Drugs. The following drugs were purchased for mouse anesthesia: ketamine (Bimeda-MTC, Cambridge, ON, Canada), xylazine (Bayer, Toronto, ON, Canada) and isoflurane (Abbott, St-Laurent, QC, Canada). For vessel studies, the following drugs were dissolved in distilled water and diluted with Krebs' solution: arterenol bitartrate salt (NE) (A-0937, Sigma, Oakville, ON, Canada); Ach chloride (A-6625, Sigma), and SNP (567538, Calbiochem, Mississauga, ON, Canada).

Statistical analysis. All values are expressed as means \pm SE except for placental pathology scores which are shown as median and 75th percentile. A p value of ≤ 0.05 was considered significant. Two-way repeated measures ANOVA were performed to assess the impact of genotype and ET on AP, vascular reactivity and the albumin/creatinine ratio. Differences in tissue weights and ratios as well as in the number of pups were analyzed by 2-way ANOVA. These analyses were all followed by Tukey's post-hoc test when an interaction was detected. Statistical differences in placental pathology scores were computed by non-parametric 2-way ANOVA.

Results

Transgenic and NT mice showed the same pattern of exercise before and throughout gestation (Figure 1). All mice diminished their physical activity naturally when pregnant, and the amount of training decreased gradually during their gestation period. All mice almost completely stopped running 2 or 3 days before delivery.

Before gestation, we found no impact of ET or genotype on either MAP (Figure 2) or proteinuria (Figure 3), assessed by the albumin/creatinine ratio. However, as reported previously[47], sedentary hAng mice presented with hypertension (Figure 2) and proteinuria (Figure 3) by the end of gestation. Conversely, their exercise trained counterparts had normal proteinuria (Figure 3), and, although MAP was significantly elevated at day 17, it tended to be lower, as seen in Figure 2, it was no longer different from that of NT females at the end of gestation and was significantly lower from the sedentary hAng females. This might be a result of the normalization of impaired vascular reactivity, since we observed an increased vasodilatory response to SNP in trained hAng mice (Figure 4). Indeed, although a reduced response to SNP was observed in sedentary hAng females compared to their NT littermates at the end of gestation, it was significantly enhanced in all trained mice (Figure 4).

In addition, placental pathology was apparent in samples from sedentary hAng mice (Table 1). It was characterized by a significant increase in hyalinization and loss of labyrinthine trophoblast structure which resulted in an elevated total placental pathology score (Table 1). Interestingly, this condition was completely normalized in trained mice,

and accompanied by similar changes in VEGF. Indeed, although we noted a significant increment in both VEGF gene and protein expression in placentas from sedentary hAng mothers, this was completely normalized in their trained counterparts (Figure 5). In addition, we found that although both cytokeratin and Ki67 placental immunostaining were increased (Figure 6 and 7) in our transgenic mothers, they were markedly reduced with exercise training. Furthermore, a slight increase in placental cytokeratin could also be detected in NT mothers. In line with these results, we observed an increased total fetal and placental mass in all trained mice, suggesting an ameliorated growth of both placentas and fetuses (Table 2). Conversely, we did not detect any significant impact of either genotype or ET on hematocrit values, litter size or length of gestation (Table 2).

As reported previously, hAng females suffered from cardiac hypertrophy at the end of gestation (Table 3). However, this was not seen in their trained counterparts. Interestingly, although we encountered no apparent renal pathology by histology, the kidney-to-body-weight ratio in sedentary hAng mice tended to be higher ($p = 0.062$) at the end of gestation, and was significantly decreased in these mice by training (Table 3). However, no effect of training could be detected in NT mice.

Discussion

To our knowledge, we are the first to clearly demonstrate that ET can prevent many PE symptoms. In our study, as reported previously[47], sedentary hAng mice developed PE-like symptoms spontaneously when they were mated with hRN males, and presented many hallmark features of the pathology, such as hypertension, proteinuria, impaired

vascular reactivity, placental alterations and cardiac hypertrophy. Our data indicates that ET completely normalized most of these symptoms. The only exception was MAP which rose significantly with gestation but was no longer different from that of NT and sedentary transgenic mice at the end of gestation. This is of importance as a lower MAP increase, accompanied with the abolishment of other PE symptoms could prevent serious complications of the disease, such as eclampsia or preterm birth. Hence, there is no doubt that ET before and during gestation confides an excellent protection against the complications of this pathology which, as yet, does not have any treatment apart from preterm delivery.

The amount of training observed in both NT and hAng mice correspond to what was previously reported in the literature for control rodents, males and females, having access to a free wheel[12, 14, 43]. Cardiovascular benefits associated to voluntary exercise training in rodents have already been demonstrated, such as increased VO₂max, diminished blood pressure as well as diminished adverse vessel remodelling [2, 25, 29, 30], and are associated to similar improvements in humans with aerobic exercise programs [34]. Therefore, our data suggests that the beneficial effects of ET described in our mouse model could be representative of what could be observed in pregnant women.

It is well-recognized that ET is an effective way of preventing and treating hypertension in non-pregnant individuals[53] and rats[2, 25]. Hence, the decrease in MAP observed in trained mice is in line with the literature. Endothelial dysfunction has been associated with hypertension and PE as the response to vasoconstrictors and vasodilators is reported

to be impaired in both these conditions[21, 37, 40]. Therefore, the normalization of impaired vascular reactivity in trained hAng mice certainly contributed to the MAP decline at the end of gestation. Indeed, improvement of vascular reactivity by ET in animals with other cardiovascular disease has been documented previously[51], and enhancement of the endothelium-independent response to SNP has also been implicated[31]. It has been postulated that ET might lower oxidative stress in the vascular endothelium by regulating antioxidant enzyme activity such as superoxide dismutase (SOD)-1 and SOD-3[27]. Extracellular (ec) SOD is increased by ET and, thus, the reduction of extracellular oxidative stress could contribute to the modulation of nitric oxide (NO) bioavailability and effect[17]. This might explain the restitution of the vasodilator response in trained preeclamptic mice but remains to be investigated. Surprisingly, acetylcholine-induced relaxation is not affected in this model even though a decrease in NO bioavailability is suggested by our SNP results. It was demonstrated that acetylcholine may induce smooth muscle cells relaxation via other vasodilators in mesenteric arteries, such as endothelial-derived depolarizing factor (EDHF)[49] or prostaglandins[3] when NO is not available. Hence, these mechanisms may compensate and thus mask abnormalities in NO bioavailability and endothelial function when looking at the Ach response in our model, although this remains to be investigated.

In the present study, we observed higher VEGF expression in the placentas from sedentary hAng compared to NT mice, which were significantly diminished when the animals were trained. This is inline with the premise that there is an anti-angiogenic shift in the placenta towards the end of gestation as there is completion of vasculogenesis in

this tissue[50]. Indeed, this is typically associated with an increase in sFlt-1 expression in normal pregnancy. However, as placental development is impaired in this animal model, VEGF remains increased possibly as a compensatory mechanism. Moreover, since angiogenic factors are secreted after hypoxia[44], it appears that placentas from sedentary transgenic mice are not adequately perfused and, consequently, express higher VEGF levels. Interestingly, similar changes were observed in placental immunostaining for both cytokeratin and Ki67 which identify trophoblast and proliferating cells respectively. Indeed, both of these markers were increased in placenta from our mouse model whereas these were both reduced with exercise training, although not completely normalized. We propose that the increase presence of these markers in the placentas from hAng supports the premise that there is an exaggerated and generalized cell proliferation which produces a loss of labyrinthine trophoblast structure as we observed by histology. The marked reduction observed with exercise training suggests that these elements are implicated in the normalization of placental development reported herein. Hence, the fact that the upregulation of VEGF and placental markers as well as placental pathology were eliminated/reduced by training is in line with the literature regarding the benefits of exercise training on placental perfusion and development in normal pregnancy[5, 51]. Indeed, it has been demonstrated that ET before and throughout pregnancy increases villous area and vascular volume in human placenta, strongly suggesting an improved placental perfusion and transport capacity[26]. Substantiating this hypothesis, we have shown that all our trained mice have an increased total placental and fetal mass. Therefore, previously reported effects of exercise training on placenta in normal pregnancy can also be observed in pathological pregnancies. We thus propose that, ET

restores angiogenic balance by rehabilitating placental development and thus eliminating hypoxia. Indeed, it is widely thought that maternal systemic symptoms might originate from the release of molecules in the hypoxic placenta[7, 8, 21].

Cardiac hypertrophy is one of the end-organ damage that can be caused by PE. As reported in the past[47], sedentary hAng mice showed a significant rise in their heart-to-body weight ratio compared to NT mice. However, this feature of PE is no longer observed in trained transgenic mice. We suggest that cardiac hypertrophy in sedentary mice was a consequence of pressure overload due to hypertension. Furthermore, it is well-known that cardiac function is improved with ET[13]. Hence, we postulate that ET, by reducing MAP can prevent cardiac hypertrophy and therefore improve cardiac function.

The molecular mechanisms by which ET can protect against PE still require further investigation. This study, however, is an important advance in our understanding of the role of ET in the prevention of this disease. The attenuation of maternal symptoms might prevent preterm delivery and eclampsia, which could reduce maternal and fetal mortality and morbidity associated to PE. Since no treatment, apart from delivery, is available to protect mothers and fetuses, such a preventive, non-pharmacological, approach is a significant step forward.

Acknowledgments

We thank Dr. Louis Gaboury for his help in the assessment of pathological symptoms present in placental and renal histological slides. We are indebted to Ovid Da Silva, Research Support Office, Research Centre, CHUM, for the editorial revision of our manuscript.

Table 11 Effect of PE and ET on placental pathology.

Placental pathology parameters														
Mother's genotype		N	Necrosis		Hyalinization		Microcalc		CIL		LLTS		Total	
			Mdn	75%	Mdn	75%	Mdn	75%	Mdn	75%	Mdn	75%	Mdn	75%
Sedentary	NT	32	1§	2	0	1	0	0	0	1	0§	1	2	3
	hAng	24	1	1.3	1‡§	1	0	0	0	1	1*§	1	3†§	5
Trained	NT	22	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	2	3
	hAng	46	2‡	2	1	1	0	0	0†	0	0‡	0	3	3

Values are expressed as median and 75th percentile. *, p≤0.05, †, p≤0.005 and ‡ p≤0.001 statistically different from the NT mice; § p≤0.001 statistically different from trained mice. CIL, Cytotrophoblastic island loss, LLTS, Loss of labyrinthine trophoblast structure; Mdn, Median; Microcalc, Microcalcification.

Table 12 Litter characteristics.

	Mother's genotype	Length of gestation (days)	Total Placental mass (mg)	Total fetal mass (mg)	Pups/litter (average)	Non-viable fetus
Sedentary	NT	18.7 ± 0.21	752.7 ± 77.4	5304.4 ± 598.6	8.6 ± 0.7	0.4 ± 0.2
	hAng	19.0 ± 0	736.0 ± 75.0	5600.0 ± 678.4	7.4 ± 0.8	0.3 ± 0.2
Trained	NT	19.0 ± 0	1004.0 ± 107.6*	6964.8 ± 940.3*	8.8 ± 0.7	0.7 ± 0.3
	hAng	19.5 ± 0.24	958.9 ± 105.4*	7358.3 ± 451.1*	9.0 ± 0.6	0.0 ± 0.0

Values are expressed as mean ± SE. * $p \leq 0.05$ statistically different from sedentary mice;

Table 13 Effect of ET and genotype on female characteristics.

	Mother's	N	BW (g)	BW (g)	Heart/BW	Kidney/BW
	genotype		(Baseline)	(end of gestation)	ratio	ratio
Sedentary	NT	11	22.0 ± 0.3	35.5 ± 0.8	6.57 ± 0.13	7.06 ± 0.14
	hAng	10	22.2 ± 0.4	36.6 ± 0.9	7.22 ± 0.28‡*	7.61 ± 0.21†
Trained	NT	7	21.7 ± 0.7	36.4 ± 1.6	6.93 ± 0.41	7.06 ± 0.14
	hAng	9	22.4 ± 0.6	37.2 ± 1.5	6.47 ± 0.17	6.83 ± 0.13

Values are expressed as mean ± SE. * $p \leq 0.05$, † $p \leq 0.001$, significantly different from trained mice. ‡ $p \leq 0.05$, significantly different from NT mice. BW, Body weight.

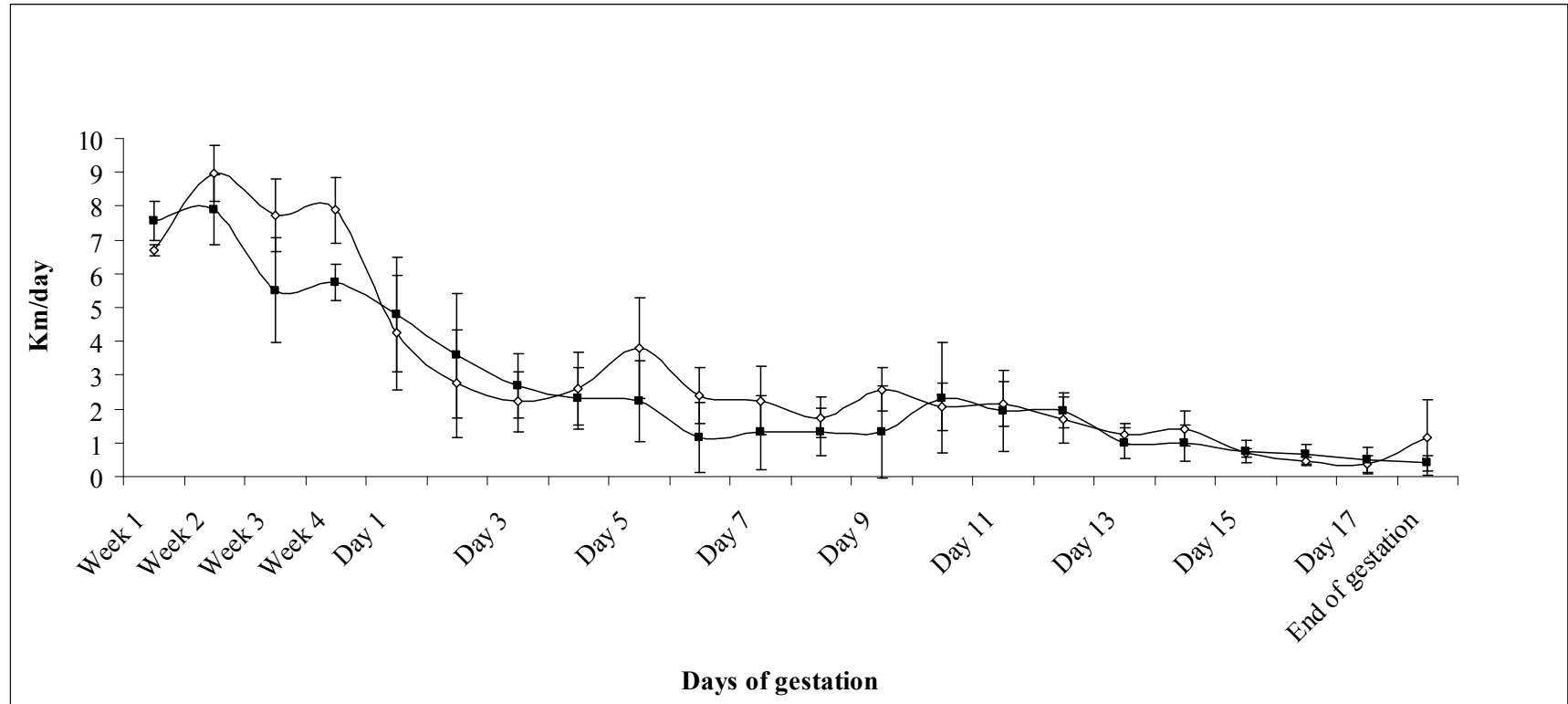


Figure 17. Average total daily running distance before and throughout gestation.

There was no difference in training patterns between hAng (black, N = 5) and NT (white, N = 4) mice. Both group trained more before than during gestation, and the amount of running decreased throughout gestation to finish by a voluntary rest period in the last 2 or 3 days prior to delivery.

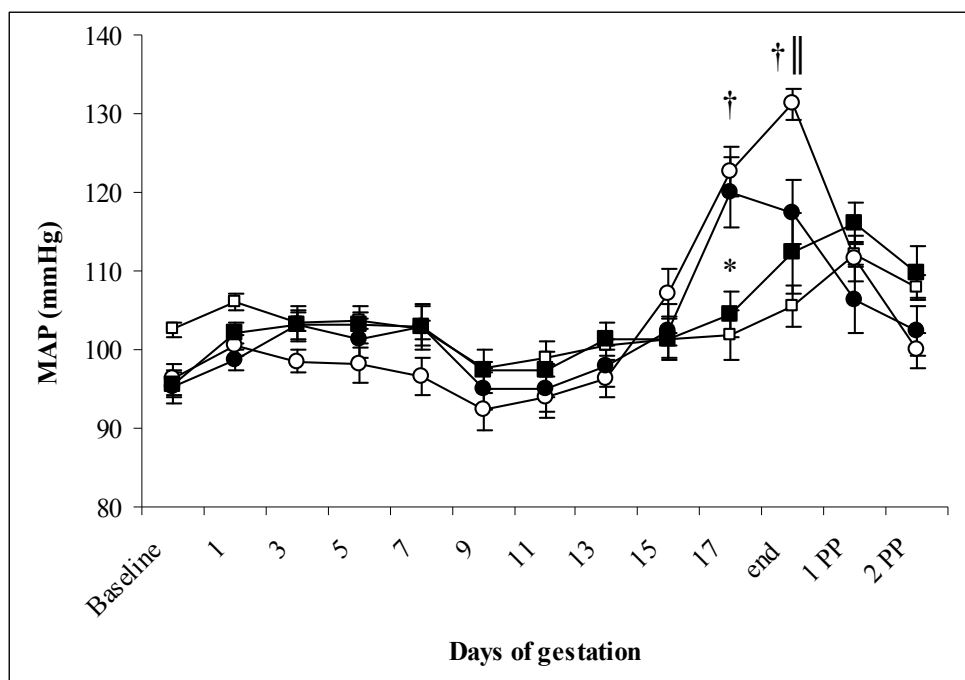


Figure 18. Effect of exercise training (ET) on mean arterial pressure (MAP) during gestation.

MAP was increased from day 17 until the end of gestation, in sedentary (white) hAng females (circles, $N = 5$) compared to NT mice (squares, $N = 8$), and returned to normal by 48 h post-partum. However, in trained (black) hAng mice ($N = 8$), the values were significantly lower compared to sedentary mothers, and were no longer significantly different from NT mice ($N = 4$) at the end of gestation. Values are expressed as means \pm SE. MAP, mean arterial pressure; PP, post-partum. * $p \leq 0.05$, and † $p \leq 0.001$, significantly different from NT females, and || $p = 0.01$, significantly different from trained mothers.

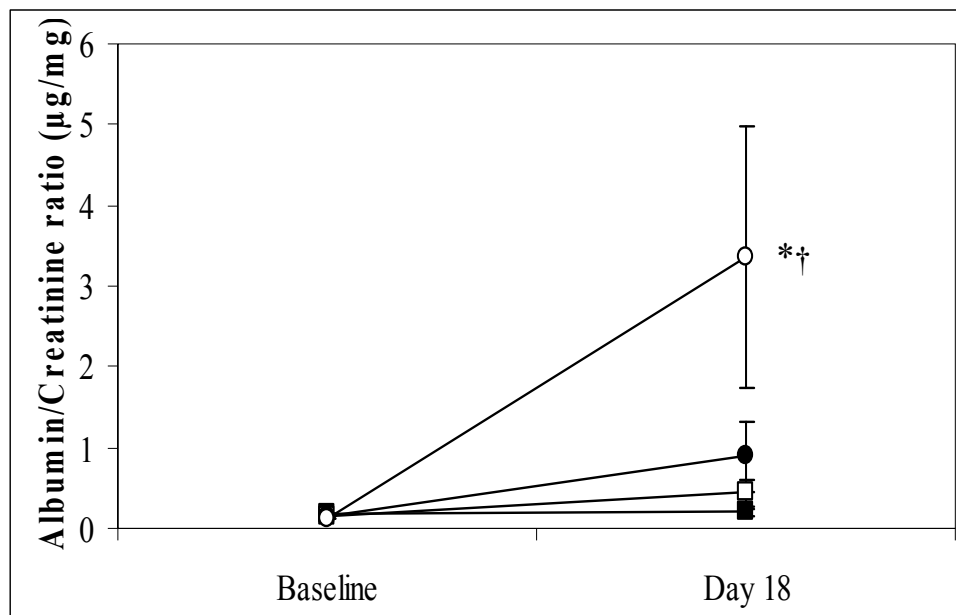


Figure 19. Effect of ET on proteinuria.

Sedentary (white) hAng mice (circles, $N = 8$) showed a significant increase in the albumin/creatinine ratio at the end of gestation compared to NT females (squares, $N = 7$). However, proteinuria was significantly decreased by training (black) in hAng mice ($N = 7$) and therefore was no longer different from NT mice ($N = 4$). Values are expressed as means \pm SE. * $p \leq 0.05$ significantly different from NT females and † $p \leq 0.05$ significantly different from trained mothers at day 18.

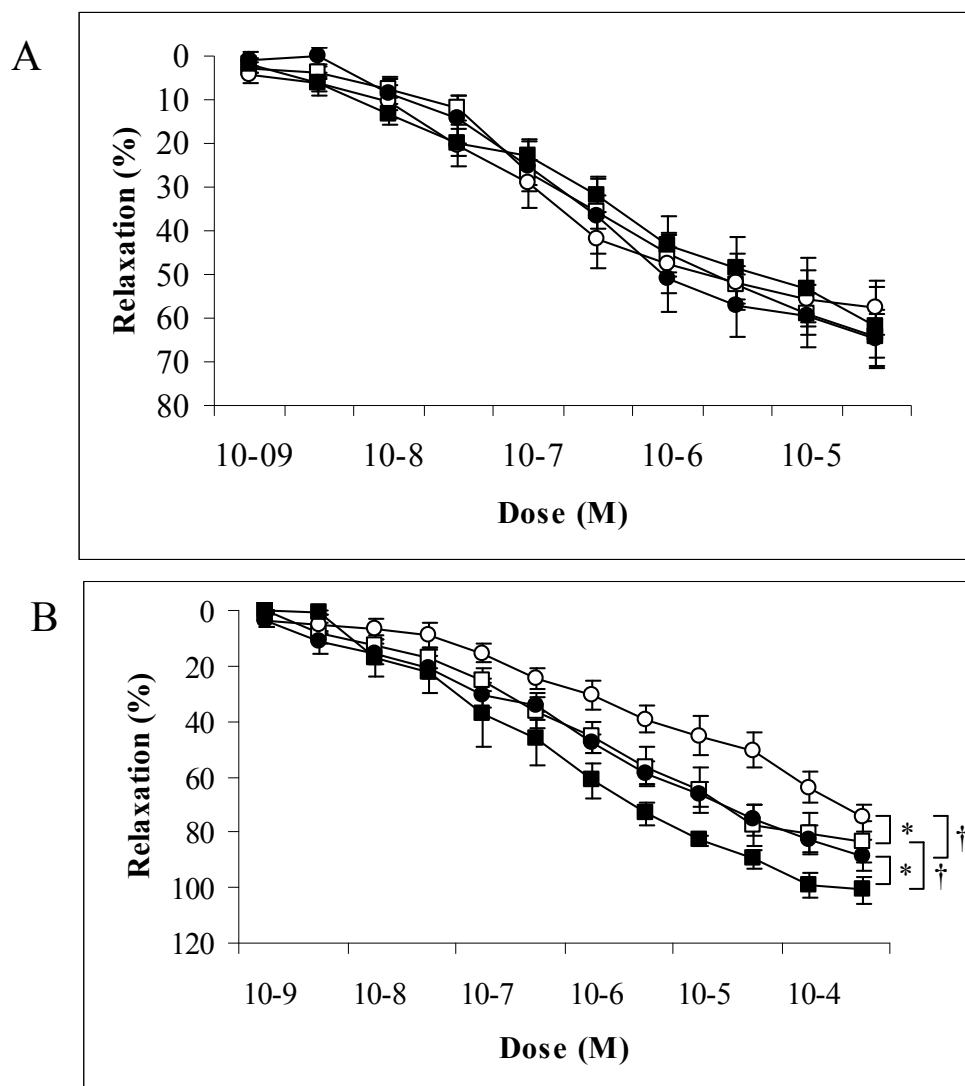


Figure 4. Mesenteric artery response to Ach and SNP.

Mesenteric arteries were collected and isolated at 18 days of gestation. We found that, although no significant difference could be observed in the response to Ach (A), significant effects of both genotype and ET could be seen with SNP (B) at the end of gestation. Indeed, hAng mice (circles, N = 9) showed a marked reduction in their response compared to NT females (squares, N = 14). However, ET (black) increased the effect of SNP compared to sedentary animals (white), completely normalizing hAng mice (N = 9), with no difference compared to NT sedentary mothers (N = 5). Values are expressed as means \pm SE. * $p \leq 0.05$ significantly different from NT mice; † $p \leq 0.005$ significant effect of ET. Ach, acetylcholine; SNP, sodium nitroprusside

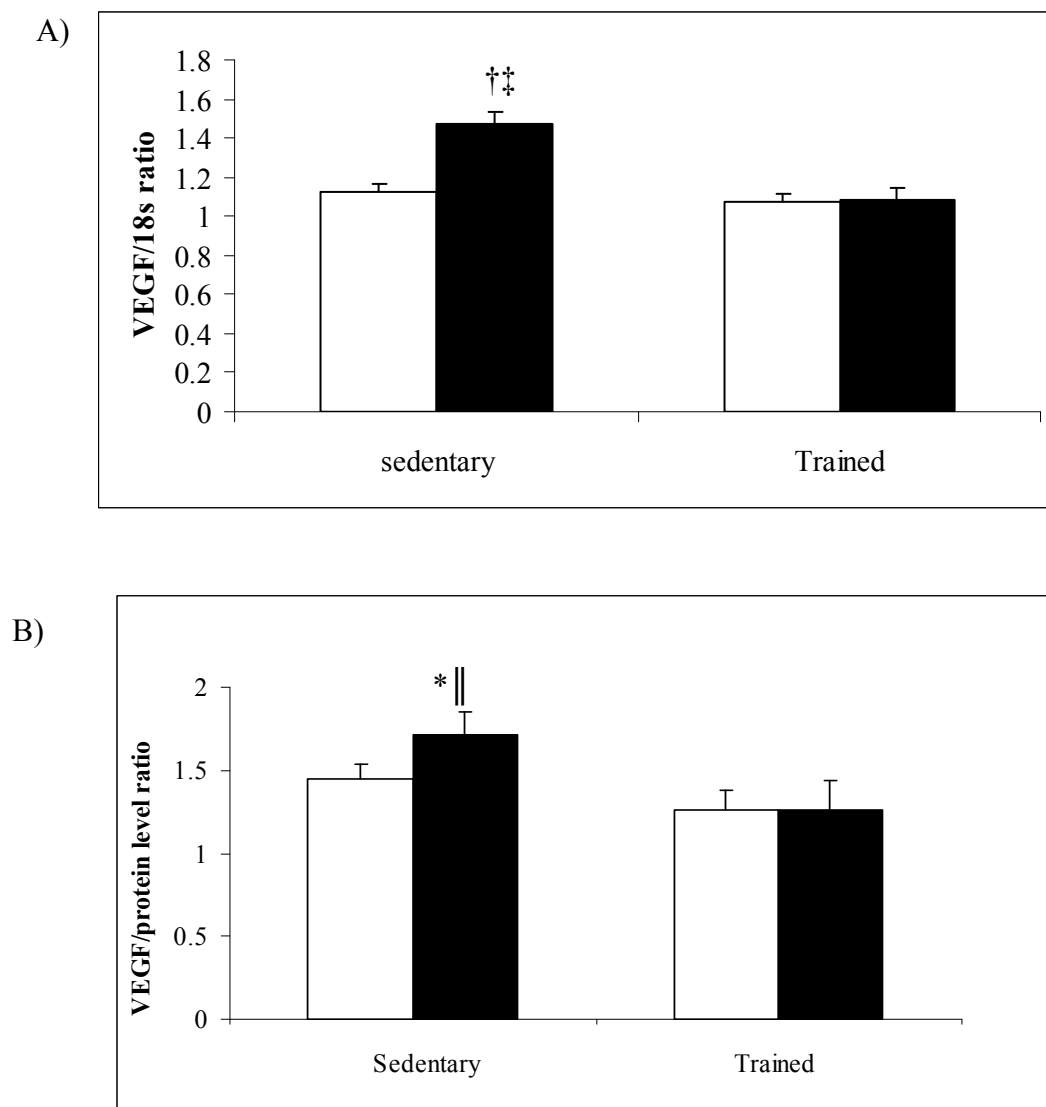


Figure 5. Placental VEGF expression.

VEGF gene (A) and protein (B) expression were both significantly increased in sedentary hAng (black) mice compared to NT (white). This increase was normalized by training and was no longer different from NT mothers. * $p < 0.05$ and † $p \leq 0.001$, significantly different from trained animals; || $p \leq 0.05$, and ‡ $p \leq 0.001$, significantly different from NT mice. VEGF gene expression: N respectively = 14 and 12 for NT sedentary and trained mice and N = 14 and 12 for hAng sedentary and trained females. VEGF protein expression: N respectively = 7 and 8 for NT sedentary and trained mice and N = 10 and 9 for hAng sedentary and trained mothers.

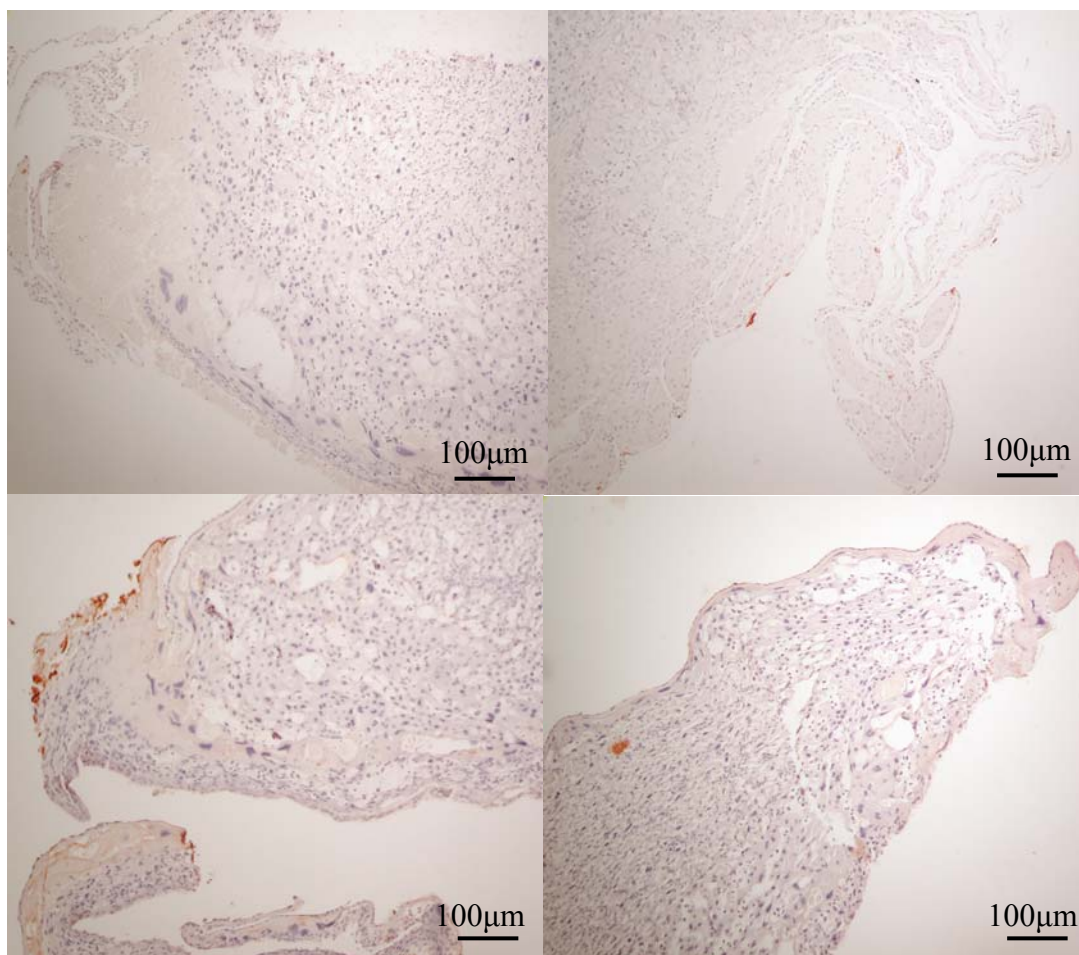


Figure 6. Representative placenta cytokeratin immunostaining.

The placental tissues presented are from sedentary and exercise trained NT (A and B respectively) and transgenic hAng mice (C and D respectively). There is a clear increase in staining when comparing the placentas from NT to the hAng which is dampened by exercise training. Furthermore, we can observe a slight increase in staining with exercise training in the placentas from NT mothers. (n = 3) magnification 200 X.

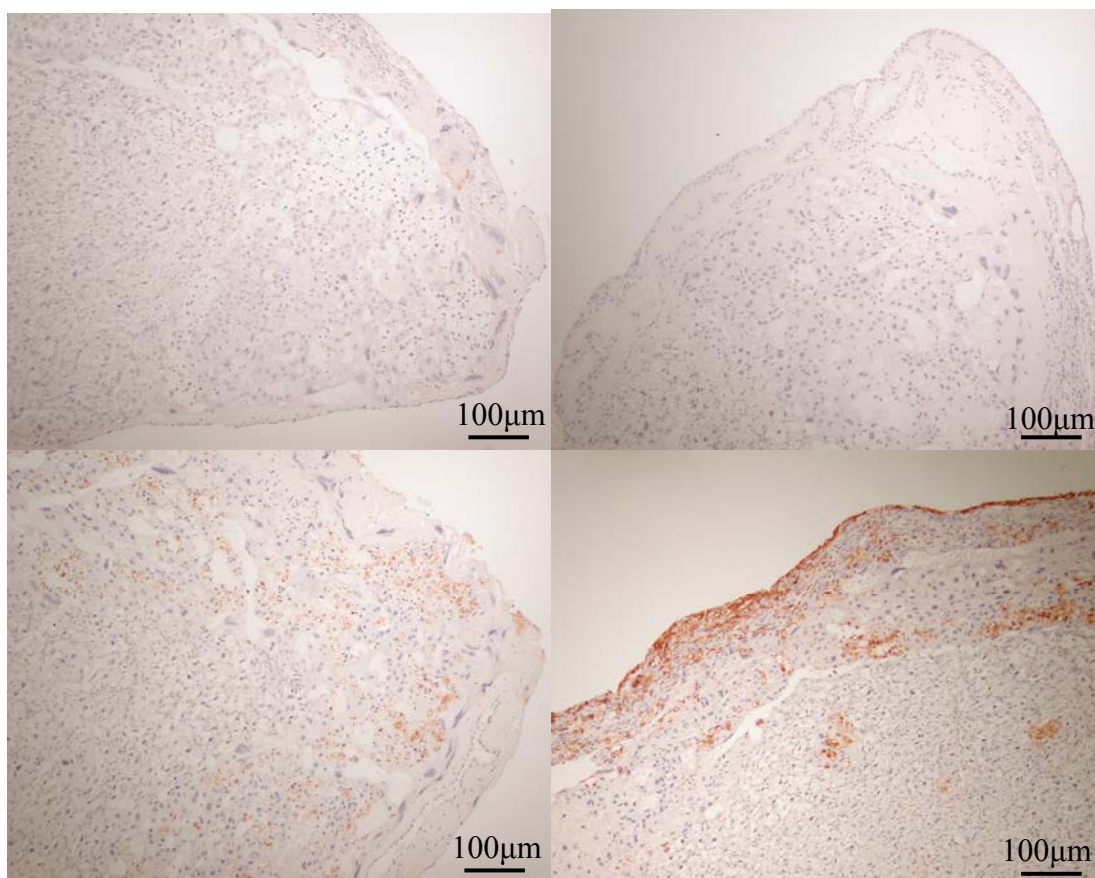


Figure 7. Representative placenta Ki67 immunostaining.

The placental tissues presented are from sedentary and exercise trained NT (A and B respectively) and transgenic hAng mice (C and D respectively). There is a clear increase in staining when comparing the placentas from NT to the hAng which is markedly reduced by exercise training. (n = 3) magnification 200 X.

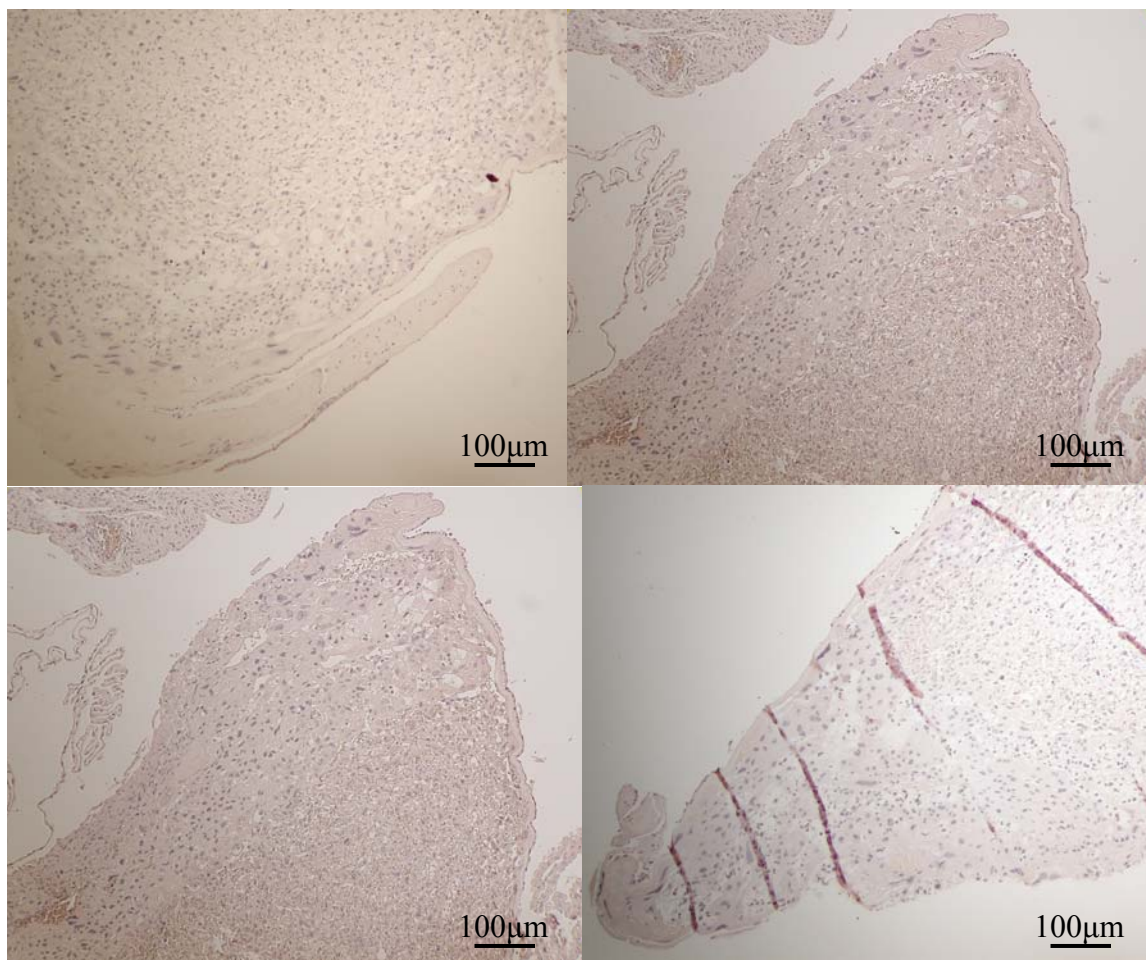


Figure 8. Control immunostaining.

The placental tissues presented are from sedentary and exercise trained NT (A and B respectively) and transgenic hAng mice (C and D respectively). As can be observed, slides receiving only the secondary antibody exhibited no staining. Magnification 200 X.

Reference List

1. Exercise during pregnancy and the postpartum period. *Clin Obstet Gynecol* 2003; **46**(2):496-499.
2. Brum PC, Da Silva GJ, Moreira ED, Ida F, Negrao CE, Krieger EM. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. *Hypertension* 2000; **36**(6):1018-1022.
3. Chataigneau T, Feletou M, Huang PL, Fishman MC, Duhault J, Vanhoutte PM. Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Br J Pharmacol* 1999; **126**(1):219-226.
4. Clapp JF. *Exercising through your pregnancy*. Omaha, Nebraska: Addicus Books, Inc.; 2002.
5. Clapp JF, III. The effects of maternal exercise on fetal oxygenation and feto-placental growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; **110 Suppl 1**:S80-S85.
6. Clapp JF. Influence of endurance exercise and diet on human placental development and fetal growth. *Placenta* 2006; **27**(6-7):527-534.
7. Cross JC. The genetics of pre-eclampsia: a feto-placental or maternal problem? *Clin Genet* 2003; **64**(2):96-103.
8. Cross JC. Placental function in development and disease. *Reprod Fertil Dev* 2006; **18**(1-2):71-76.
9. Damm P, Breitowicz B, Hegaard H. Exercise, pregnancy, and insulin sensitivity--what is new? *Appl Physiol Nutr Metab* 2007; **32**(3):537-540.
10. Danson EJ, Paterson DJ. Enhanced neuronal nitric oxide synthase expression is central to cardiac vagal phenotype in exercise-trained mice. *J Physiol* 2003; **546**(Pt 1):225-232.

11. Davisson RL, Hoffmann DS, Butz GM, Aldape G, Schlager G, Merrill DC, et al. Discovery of a spontaneous genetic mouse model of preeclampsia. *Hypertension* 2002; **39**(2 Pt 2):337-342.
12. Dohm MR, Richardson CS, Garland T, Jr. Exercise physiology of wild and random-bred laboratory house mice and their reciprocal hybrids. *Am J Physiol* 1994; **267**(4 Pt 2):R1098-R1108.
13. Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev* 2008; **88**(3):1009-1086.
14. Eisele JC, Schaefer IM, Randel NJ, Post H, Liebetanz D, Bruel A, et al. Effect of voluntary exercise on number and volume of cardiomyocytes and their mitochondria in the mouse left ventricle. *Basic Res Cardiol* 2008; **103**(1):12-21.
15. Falcao S, Bisotto S, Gutkowska J, Lavoie JL. Hyperhomocysteinemia is not sufficient to cause preeclampsia in an animal model: the importance of folate intake. *Am J Obstet Gynecol* 2009; **200**(2):198.e1-198.e5.
16. Falcao S, Solomon C, Monat C, Berube J, Gutkowska J, Lavoie JL. Impact of diet and stress on the development of preeclampsia-like symptoms in p57kip2 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; **296**(1):H119-H126.
17. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest* 2000; **105**(11):1631-1639.
18. Fukamizu A, Seo MS, Hatae T, Yokoyama M, Nomura T, Katsuki M, et al. Tissue-specific expression of the human renin gene in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; **165**:826-832.
19. Fukamizu A, Sugimura K, Takimoto E, Sugiyama F, Seo M-S, Takahashi S, et al. Chimeric renin-angiotensin system demonstrates sustained increase in blood

- pressure of transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes. *J Biol Chem* 1993; **268**:11617-11621.
20. Furuya M, Ishida J, Inaba S, Kasuya Y, Kimura S, Nemori R, et al. Impaired placental neovascularization in mice with pregnancy-associated hypertension. *Lab Invest* 2008; **88**(4):416-429.
 21. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; **294**(2):H541-H550.
 22. Haubold KW, Allen DL, Capetanaki Y, Leinwand LA. Loss of desmin leads to impaired voluntary wheel running and treadmill exercise performance. *J Appl Physiol* 2003; **95**(4):1617-1622.
 23. Hegaard HK, Pedersen BK, Nielsen BB, Damm P. Leisure time physical activity during pregnancy and impact on gestational diabetes mellitus, pre-eclampsia, preterm delivery and birth weight: a review. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007; **86**(11):1290-1296.
 24. Hoppe CC, Moritz KM, Fitzgerald SM, Bertram JF, Evans RG. Transient hypertension and sustained tachycardia in mice housed individually in metabolism cages. *Physiol Res* 2009; **58**(1):69-75.
 25. Horta PP, de Carvalho JJ, Mandarim-de-Lacerda CA. Exercise training attenuates blood pressure elevation and adverse remodeling in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 2005; **77**(26):3336-3343.
 26. Jackson MR, Gott P, Lye SJ, Ritchie JW, Clapp JF, III. The effects of maternal aerobic exercise on human placental development: placental volumetric composition and surface areas. *Placenta* 1995; **16**(2):179-191.

27. Kojda G, Hambrecht R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc Res* 2005; **67**(2):187-197.
28. Lachmeijer AM, Dekker GA, Pals G, Aarnoudse JG, ten Kate LP, Arngrimsson R. Searching for preeclampsia genes: the current position. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; **105**(2):94-113.
29. Lambert MI, Noakes TD. Spontaneous running increases VO₂max and running performance in rats. *J Appl Physiol* 1990; **68**(1):400-403.
30. MacNeil B, Hoffman-Goetz L. Chronic exercise enhances in vivo and in vitro cytotoxic mechanisms of natural immunity in mice. *J Appl Physiol* 1993; **74**(1):388-395.
31. Maiorana A, O'Driscoll G, Dembo L, Cheetham C, Goodman C, Taylor R, et al. Effect of aerobic and resistance exercise training on vascular function in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; **279**(4):H1999-H2005.
32. Malassine A, Frendo JL, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum Reprod Update* 2003; **9**(6):531-539.
33. Meher S, Duley L. Exercise or other physical activity for preventing pre-eclampsia and its complications. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; (2):CD005942.
34. Meka N, Katragadda S, Cherian B, Arora RR. Endurance exercise and resistance training in cardiovascular disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2008; **2**(2):115-121.
35. Montan S. Drugs used in hypertensive diseases in pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004; **16**(2):111-115.
36. Moutquin JM, Garner PR, Burrows RF, Rey E, Helewa ME, Lange IR, et al. Report of the Canadian Hypertension Society Consensus Conference: 2.

Nonpharmacologic management and prevention of hypertensive disorders in pregnancy. *CMAJ* 1997; **157**(7):907-919.

37. Munzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med* 2008; **40**(3):180-196.
38. Myatt L, Webster RP. Vascular biology of preeclampsia. *J Thromb Haemost* 2009; **7**(3):375-384.
39. Peterson JA. Get moving! Physical activity counseling in primary care. *J Am Acad Nurse Pract* 2007; **19**(7):349-357.
40. Poston L. Endothelial dysfunction in pre-eclampsia. *Pharmacol Rep* 2006; **58 Suppl**:69-74.
41. Roberts JM, Lain KY. Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta* 2002; **23**(5):359-372.
42. Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2001; **2**(7):538-548.
43. Russell JC, Epling WF, Pierce D, Amy RM, Boer DP. Induction of voluntary prolonged running by rats. *J Appl Physiol* 1987; **63**(6):2549-2553.
44. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep* 2008; **41**(4):278-286.
45. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; **365**(9461):785-799.
46. Sigmund CD, Jones CA, Kane CM, Wu C, Lang JA, Gross KW. Regulated tissue- and cell-specific expression of the human renin gene in transgenic mice. *Circ Res* 1992; **70**:1070-1079.

47. Takimoto E, Ishida J, Sugiyama F, Horiguchi H, Murakami K, Fukamizu A. Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science* 1996; **274**(5289):995-998.
48. Takimoto-Ohnishi E, Saito T, Ishida J, Ohnishi J, Sugiyama F, Yagami K, et al. Differential roles of renin and angiotensinogen in the feto-maternal interface in the development of complications of pregnancy. *Mol Endocrinol* 2005; **19**(5):1361-1372.
49. Waldron GJ, Ding H, Lovren F, Kubes P, Triggle CR. Acetylcholine-induced relaxation of peripheral arteries isolated from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1999; **128**(3):653-658.
50. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda)* 2009; **24**:147-158.
51. Weissgerber TL, Wolfe LA, Davies GA. The role of regular physical activity in preeclampsia prevention. *Med Sci Sports Exerc* 2004; **36**(12):2024-2031.
52. Weissgerber TL, Wolfe LA, Davies GA, Mottola MF. Exercise in the prevention and treatment of maternal-fetal disease: a review of the literature. *Appl Physiol Nutr Metab* 2006; **31**(6):661-674.
53. Whelton SP, Chin A, Xin X, He J. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med* 2002; **136**(7):493-503.
54. Wong AY, Kulandavelu S, Whiteley KJ, Qu D, Langille BL, Adamson SL. Maternal cardiovascular changes during pregnancy and postpartum in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; **282**(3):H918-H925.
55. Yang G, Merrill DC, Thompson MW, Robillard JE, Sigmund CD. Functional expression of the human angiotensinogen gene in transgenic mice. *J Biol Chem* 1994; **269**(51):32497-32502.

Chapitre 11 – Discussion

Les travaux que nous avons effectués au cours des trois dernières années ont certainement participé à la compréhension de divers mécanismes impliqués dans le développement et la prévention de la prééclampsie. En effet, que ce soit par la caractérisation d'un nouveau modèle animal de prééclampsie, ou en évaluant l'impact qu'ont la diète, le stress et l'entraînement physique par rapport à la génétique dans le déclenchement de cette maladie, notre projet aura contribué à l'avancement de la recherche concernant la prééclampsie.

La première conclusion importante que nous avons pu tirer est que ni les altérations placentaires ni la prédisposition génétique ne sont suffisantes à elles seules pour déclencher les symptômes maternels de la prééclampsie dans le modèle de souris $p57kip2^{(-/+)}$ (53). En effet, malgré que nous ayons obtenu ces souris du groupe-même qui les avaient caractérisées(225), les symptômes diagnostiques de la prééclampsie n'ont jamais été observés chez ces souris dans notre laboratoire.

Nous ne pouvons cependant exclure que le croisement des souris fournies, $p57kip2^{(-/+)}$, avec des souris C57BL/6 nord-américaines plutôt que japonaises ait eu impact sur le phénotype observé. En effet, il a déjà été rapporté que des lignées provenant de fournisseurs différents étaient différentes(240;241), ce qui pourrait expliquer que la génétique des souris $p57kip2^{(-/+)}$ dans notre laboratoire ne soit pas exactement identique à celle de ces souris au Japon. Néanmoins, nous avons utilisé

les premières souris que nous avons reçues du Japon pour vérifier que le phénotype était bien reproductible dans notre laboratoire et ce n'était pas le cas. Toutefois, ces souris étaient nourries avec la diète nord-américaine (N-A) à ce moment-là. Il est donc possible qu'une interaction diète-génétique était nécessaire à l'apparition des symptômes dans ce modèle. La génétique ne serait tout de même pas suffisante à elle-seule pour induire les symptômes de prééclampsie dans ce modèle.

Une observation très intéressante rapportée dans cet article est que la diète japonaise (JPN) a, à elle-seule, des effets significatifs sur les mères normales, soit $p57kip2^{+/+}$. En effet, le simple changement de diète a eu un impact significatif quant à la diminution du poids des mères avant et à la fin de la gestation. De plus, le ratio du poids du ventricule gauche sur le poids du cœur, ainsi que le poids des reins étaient tous augmentés. Le poids des bébés de ces mères ainsi que le nombre du bébé par portée était diminué. Le résultat le plus étonnant est l'effet qu'a la diète JPN sur la fonction endothéliale des mères $p57kip2^{+/+}$. La réponse à l'acétylcholine ainsi qu'au SNP est compromise dans les artères mésentériques de ces mères en comparaison avec les mères $p57kip2^{(-/+)}$, ainsi que par rapport aux mères nourries à la diète N-A. Nous ne savons pas pourquoi nous obtenons de tels résultats, cependant, ceux-ci soulignent l'impact que peut avoir la diète sur des souris normales, ce qui devrait toujours être pris en considération lors d'études faites chez les animaux, pour les comparaisons soient justes. La sensibilité à la norépinephrine est augmentée chez les mères $p57kip2^{(-/+)}$ nourries à la diète JPN, suggérant que la diète pourrait être un des facteurs menant au développement de certains symptômes de la prééclampsie chez ces souris. On peut

aussi remarquer sur la courbe de réponse à la norépinephrine que la sensibilité à cet agent tend à être diminuée chez les mères p57kip2^(+/+) à la moitié du graphique. Cette diminution n'est pas significative, cependant, une courbe de 4 paramètres nous aurait peut-être permis d'observer plus de différences.

Malgré l'impact significatif de la diète sur divers paramètres impliqués dans la maladie, il y a nécessairement d'autres différences entre l'environnement auquel les souris étaient confrontées au Japon en comparaison à celui dans lequel elles vivaient dans notre animalerie puisque le phénotype n'était toujours pas rétabli. Étant donné que les méthodes utilisées pour mesurer la pression artérielle ainsi que la protéinurie n'étaient pas les mêmes, nous avons émis l'hypothèse que le stress causé par ces dernières pouvaient être à l'origine du déclenchement de la maladie. En effet, la méthode de *tail-cuff*, qui nécessite d'immobiliser les souris éveillées pour attacher un capteur à leur queue et mesurer leur pression artérielle, ainsi que l'utilisation de cages métaboliques pour collecter l'urine sont toutes deux des techniques qui ont été démontrées comme étant stressantes pour les souris(238;242). Nous n'avons observé aucune augmentation de pression en faisant subir un stress d'immobilisation à nos souris, cependant, nous n'avons fait subir ce stress à nos souris qu'une seule fois, en fin de gestation. Peut-être que la réponse aurait été différente si ce stress avait été subi à chaque jour de la gestation, tel que ça aurait été le cas si nous avions utilisé la méthode de *tail cuff* pour mesurer leur pression artérielle. Toutefois, une autre étude portant sur ces mêmes souris(226), lors de laquelle la méthode du *tail cuff* avait été utilisée, ne rapportait pas l'augmentation notée par le groupe japonais. Par contre, tel

que déjà rapporté(238), nous croyons que l'utilisation de cages métaboliques pour collecter l'urine puisse avoir eu un impact sur l'élévation de la pression artérielle des souris au Japon.

Il nous a été impossible de trouver l'élément clé qui avait fait la différence sur le déclenchement de la prééclampsie dans ce modèle animal. Évidemment, une panoplie d'éléments et d'événements peuvent avoir eu un effet important sur ces souris au Japon. Il est impossible pour nous d'évaluer à distance tous les paramètres qui différaient d'un laboratoire à l'autre, que ce soit le traitement des animaux dans l'animalerie, en passant par la provenance et la constitution en ions de l'eau donnée à celles-ci. Il est fort probable que l'accumulation de plusieurs petits facteurs aura fait la différence sur le phénotype. Il est alors évident pour nous que le modèle de souris $p57^{kip2}$ n'en est pas un de prééclampsie, mais qu'il est toutefois un très bon modèle pour étudier les altérations placentaires, qui peut être d'un grand intérêt dans l'étude des mécanismes liés à la placentation inadéquate qui est à l'origine de plusieurs troubles de la grossesse.

Nous avons aussi caractérisé le premier modèle animal qui représente la réalité clinique des femmes qui développent la prééclampsie superposée à de l'hypertension chronique (SPE). En effet, l'hypertension chronique est un facteur de risque important de cette maladie, et les femmes qui en sont atteintes développent dans 25% des cas de la prééclampsie lorsqu'elles sont enceintes(243). Les souris R^+A^+ qui surexpriment l'angiotensinogène et la rénine humaine sont hypertendues et développent plusieurs

symptômes de la prééclampsie lors de leur gestation. Notre modèle en est donc un de SPE. Bien que la grossesse normale soit associée à une augmentation du RAS alors que lors de la prééclampsie, une absence de l'élévation des composantes circulantes de ce système est souvent rapportée(15), des études épidémiologiques ont aussi démontrées que les femmes ayant des mutations favorisant l'élévation du RAS systémique étaient plus sujettes au développement de la prééclampsie(244). Il est connu que la stimulation du récepteur AT1 favorise la production et la relâche de sFlt-1 ainsi que la production de radicaux libres via la stimulation de la NADP(H) oxydase(103). Il est fort probable que les symptômes que nous observons soient dus à la surexpression du RAS et par conséquent aux grandes quantités d'AngII qui sont présentes dans notre modèle. Nous ne savons pas si la sensibilité à ce peptide vasoconstricteur est augmentée avec la gestation dans notre modèle, mais ceci pourra éventuellement être vérifié et, si tel était le cas, notre modèle aurait par conséquent une autre similarité avec les femmes souffrant de prééclampsie. L'augmentation de l'expression placentaire et plasmatique du sFlt-1 dans notre modèle pourrait aussi expliquer que les souris développent de la protéinurie seulement au cours de leur grossesse et non avant malgré qu'elles soient déjà hypertendues. Il a été remarqué chez les patients souffrant de cancer qui étaient traités avec des inhibiteurs du VEGF que ceux-ci développaient de la protéinurie(245). Nous croyons aussi que les niveaux élevés d'AngII en circulation favorisent la production des ROS via l'activation du récepteur AT1, ce qui peut avoir des effets délétères notamment sur l'endothélium vasculaire, induisant par la suite une dysfonction endothéliale qui se manifeste par une réponse accrue aux vasoconstricteurs et conséquemment par une augmentation de la

pression artérielle(34;127;246). Ceci, additionné aux espèces délétères qui peuvent être relâchées en circulation par le placenta, pourrait expliquer l'augmentation de la pression avec la grossesse. Il serait donc intéressant de faire une étude qui permettrait de regarder à quels moments de la gestation, quelles molécules interviennent dans chaque tissu. Ceci nous permettrait de voir par exemple si des molécules délétères apparaissent dans le placenta avant d'être présentes en circulation et/ou si une dysfonction endothéliale est observable avant l'augmentation significative de la pression artérielle. La mesure du stress oxydant et de l'expression des enzymes antioxydantes pourrait sans aucun doute faire partie de cette étude.

L'hypertrophie cardiaque pathologique chez la souris R^+A^+ est confirmée par la diminution de leur fonction cardiaque avant la gestation et qui se détériore avec la grossesse. Ceci n'est pas observé chez les souris gestantes saines, malgré que leur cœur soit hypertrophié. Il est connu que l'hypertension artérielle induit une hypertrophie cardiaque pathologique et que la stimulation des récepteurs AT1 par l'AngII est aussi une cause de l'induction de ces altérations au niveau du cœur(142). Nous proposons qu'une combinaison de ces deux facteurs soit à l'origine des altérations observées. Il sera intéressant d'étudier le rôle que jouent l'AngIV et son récepteur, l'IRAP, dans l'hypertrophie cardiaque physiologique induite par la grossesse ainsi qu'en prééclampsie. En effet, il a été démontré que l'AngIV via son récepteur, l'IRAP, avait des effets anti-hypertrophiques(247). Une étude sur la fonction cardiaque a démontré que l'AngIV exerce des effets inverses à ceux produit par l'AngII sur le cœur(248). De plus, les effets hypertrophiques de l'AngII sont

bloqués par l'AngIV(249). L'IRAP est entre autres exprimée dans le cœur où elle dégrade plusieurs vasoconstricteurs(250) et ses concentrations circulantes sont augmentées chez la femme enceinte, alors qu'elles ne le sont pas lors d'une grossesse prééclampsique, suggérant son implication dans la régulation des phénotypes observés(20;251;252).

Le poids réduit des souriceaux, suggérant la présence d'IUGR, est probablement une conséquence des altérations placentaires observées dans notre modèle. En effet, les placentas des souris R^+A^+ sont nécrosés et ne présentent pas une structure normale au niveau du labyrinthe, suggérant une mauvaise irrigation ainsi que des échanges inadéquats entre le fœtus et sa mère, ce qui peut facilement expliquer le fait que les souriceaux aient une croissance compromise. La surexpression du facteur sFlt-1 par le placenta peut expliquer que ces derniers soient mal irrigués puisque ce facteur anti-angiogénique bloque les effets du VEGF(101). Cependant, il est impossible à ce moment d'établir si l'hypertension artérielle chez nos souris induit les altérations placentaires ou si cette dernière contribue aux symptômes maternels observés.

Les mécanismes via lesquels les symptômes de la prééclampsie sont déclenchés dans ce modèle sont encore inconnus, tout comme ceux à l'origine des mêmes symptômes chez les femmes qui développent la SPE. La caractérisation de ce modèle permettra donc de mieux saisir cette réalité clinique qui reste encore incomprise. Chaque mécanisme élucidé peut permettre de trouver des cibles de

traitement afin d'atténuer ou normaliser les symptômes de cette maladie et ainsi protéger et améliorer la vie des mères à risque et celle de leur fœtus.

Étant donné que l'entraînement physique est recommandé pour prévenir et traiter d'autres maladies cardiovasculaires, et qu'il est aussi conseillé lors de la grossesse normale, nous avons émis l'hypothèse que ce dernier pourrait prévenir le déclenchement de la prééclampsie dans un modèle animal de la maladie en atténuant ou normalisant ses symptômes. À l'aide d'un modèle transgénique de la prééclampsie, les souris hAng accouplées à des mâles hRN nous avons pu démontrer que malgré une prédisposition génétique à développer cette maladie, les symptômes de la prééclampsie étaient atténués, et souvent normalisés dans ce modèle avec l'entraînement physique. Il est connu que l'entraînement physique réduit la pression artérielle, notamment en favorisant la relâche ainsi que la disponibilité du NO(172). Ceci pourrait expliquer la normalisation de la pression artérielle que nous observons chez les souris hAng entraînées en fin de grossesse, étant donné que leur réponse au SNP est également rétablie. Cette meilleure réponse au NO pourrait être en partie due à une diminution de sa dégradation. En effet, l'entraînement physique peut réduire le stress oxydant, notamment en augmentant l'expression d'enzymes antioxydantes(173), ce qui peut améliorer la disponibilité du NO(253). Dans le même ordre d'idée, la prévention de l'élévation de la pression artérielle en fin de gestation, ainsi que la meilleure réponse au NO dans ce modèle peut expliquer la normalisation de la protéinurie. En effet, l'hypertension artérielle a été associée à la protéinurie(254). La normalisation de l'hypertrophie cardiaque chez les souris entraînées est probablement

en partie due à la diminution de leur pression artérielle. Aussi, il est connu que l'entraînement physique est cardioprotecteur en améliorant notamment la perfusion du muscle cardiaque et par conséquent sa fonction(255).

Une amélioration de la perfusion du placenta due à une réponse améliorée au NO pourrait justifier que les altérations placentaires soient normalisées dans notre modèle. Les résultats concernant l'expression du VEGF sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'entraînement physique favorise la perfusion du placenta. En effet, l'augmentation de l'expression du VEGF chez les souris hAng suggère la présence d'hypoxie dans le modèle, ce qui est normalisé par l'entraînement physique. La tension d'oxygène (P_{O_2}) est impliquée dans le développement adéquat du placenta et de son irrigation. En effet, il a été rapporté que le changement de P_{O_2} de 20 à 50 mm Hg vers 10-12 semaines de grossesse chez la femme permettait aux cytotrophoblastes de passer d'un mode prolifératif à un mode invasif. Hors, les placentas des souris hAng sédentaires montrent des signes de prolifération démesurée, autant en histologie que par immunomarquage, ainsi qu'une expression augmentée de VEGF à 18 jours de gestation. Ces résultats suggèrent que la pression d'oxygène nécessaire n'est toujours pas présente à 18 jours de gestation et que le placenta est toujours en mode prolifératif(9-11).

Il serait maintenant intéressant de mesurer l'expression d'autres facteurs qui pourraient confirmer que le placenta est toujours à ce stade, soit HIF1 et TGF β 3 dont l'expression est normalement élevée avant le changement de P_{O_2} et diminuée ensuite(12).

Outre l'amélioration de la réponse au sodium nitroprusside, nous avons pu observer une amélioration de la croissance placentaire et foetale due à l'entraînement physique autant chez nos souris NT qu'hAng. Ces résultats sont conformes avec ceux d'études révisées par J.F. Clapp en 2006, qui ont rapportées des bénéfices de l'entraînement physique sur le poids des placentas et des fœtus(194). Ces résultats suggèrent que l'entraînement favorise la capacité de transport au niveau du placenta et du fœtus.

Il est évident que la quantité de course faite par nos souris est impressionnante, cependant la course volontaire à partir d'une roue libre dans la cage de rongeurs a été étudiée auparavant et nos souris courent normalement(256;257). Les bénéfices cardiovasculaires découlant de ce type d'entraînement ont été rapporté comme étant similaires à ceux engendrés chez l'homme suite à un entraînement cardiovasculaire d'environ 45 minutes, de 3 à 4 fois par semaine(258-260). De plus, il est très intéressant de voir que nos souris régulent leur entraînement naturellement en diminuant leur quantité de course automatiquement lors du premier jour de leur gestation et en diminuant progressivement leur exercice quotidien au fur et à mesure que leur grossesse avance. Finalement, elles deviennent presque sédentaires environ 3 à 4 jours avant la mise bas. Ces observations correspondent de façon assez intéressante à ce qu'une femme enceinte ferait de façon instinctive. Aussi, étant donné que la course se fait dans une roue, il est évident que cet exercice est moins ardu que si la course se faisait sur le sol, puisqu'une fois le premier "coup de roue" engendré, les

autres sont plus faciles à produire. Nous comparerions donc cet entraînement physique davantage à l'utilisation d'un appareil elliptique qu'à de la course.

Les résultats obtenus et rapportés dans cette thèse quant à l'implication de la diète, du stress et de l'entraînement physique sur la prééclampsie contribuent tous à mieux comprendre cette maladie et souligne l'importance de tenir compte de ces facteurs dans la prévention et le traitement éventuel de celle-ci. Notre étude sur l'entraînement physique est la première à établir un lien de cause à effet quant à l'impact de l'entraînement physique sur l'atténuation et la normalisation des symptômes de la prééclampsie. Ce type d'étude fondamentale permettra non seulement de mieux comprendre les mécanismes via lesquels l'entraînement physique peut être protecteur mais aussi encouragera la création d'études cliniques randomisées étudiant ce même phénomène chez la femme. La démonstration des effets préventifs de l'entraînement physique sur la prééclampsie lors de grandes études cliniques est nécessaire à la modification des recommandations faites par *l'American College of Gynecology and Obstetrics*. Évidemment, la recherche fondamentale en ce sens ne s'arrête pas ici. Il sera intéressant d'étudier plus en profondeur les mécanismes impliqués dans cette protection, soit au niveau du stress oxydant, de l'angiogénèse et de la fonction endothéliale. En effet, l'élucidation des mécanismes impliqués pourrait donner des nouvelles pistes quand aux phénomènes impliqués dans la maladie. Aussi, il sera approprié de vérifier si les effets l'entraînement physique sont aussi efficaces si celui-ci est pratiqué seulement avant le début de la grossesse ou bien s'il l'est uniquement dès le commencement de celle-ci. De plus, il sera pertinent d'évaluer si

les effets protecteurs de l'entraînement physique sont observés dans d'autres modèles animaux de la prééclampsie.

La caractérisation du premier modèle animal représentant la réalité clinique des femmes hypertendues qui développent de la SPE est certainement un apport considérable qui permettra éventuellement d'élucider les causes mécanistiques de cette maladie. De plus, il sera un outil très utile afin d'évaluer de nouveaux traitements pour cette maladie. Il sera aussi très intéressant de vérifier si l'entraînement physique pourrait prévenir la SPE dans ce modèle de souris.

Mis ensemble, nos résultats aideront à trouver des cibles pour prévenir ou traiter cette maladie. Le travail en ce sens est encore à faire, mais les outils que nous avons fournis seront d'une aide considérable pour un jour connaître et cibler les facteurs déclenchant cette maladie et par conséquent réduire le nombre de mères et de fœtus qui en subissent les graves conséquences.

BibliographieReference List

- (1) Osol G, Mandala M. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. Physiology (Bethesda) 2009; 24:58-71.

- (2) Palmer SK, Zamudio S, Coffin C, Parker S, Stamm E, Moore LG. Quantitative estimation of human uterine artery blood flow and pelvic blood flow redistribution in pregnancy. *Obstet Gynecol* 1992; 80(6):1000-1006.
- (3) Salamonsen LA, Dimitriadis E, Jones RL, Nie G. Complex regulation of decidualization: a role for cytokines and proteases--a review. *Placenta* 2003; 24 Suppl A:S76-S85.
- (4) Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(9):656-663.
- (5) Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 5:6.
- (6) Castellucci M, Kosanke G, Verdenelli F, Huppertz B, Kaufmann P. Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development. *Hum Reprod Update* 2000; 6(5):485-494.
- (7) Fox H. Aging of the placenta. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997; 77:F171-F175.
- (8) Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 2000; 157(6):2111-2122.
- (9) Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 1997; 277(5332):1669-1672.
- (10) Caniggia I, Winter J, Lye SJ, Post M. Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta* 2000; 21 Suppl A:S25-S30.
- (11) Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. *Endocrinology* 2006; 147(4):1675-1684.
- (12) Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(9):4304-4308.
- (13) Ng YS, Ramsauer M, Loureiro RM, D'Amore PA. Identification of genes involved in VEGF-mediated vascular morphogenesis using embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies. *Lab Invest* 2004; 84(9):1209-1218.
- (14) Gilson GJ, Samaan S, Crawford MH, Qualls CR, Curet LB. Changes in hemodynamics, ventricular remodeling, and ventricular contractility during normal pregnancy: a longitudinal study. *Obstet Gynecol* 1997; 89(6):957-962.

- (15) Shah DM. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288(4):F614-F625.
- (16) Massicotte G, St-Louis J, Parent A, Schiffrin EL. Decreased in vitro responses to vasoconstrictors during gestation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1987; 65(12):2466-2471.
- (17) Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 2008; 264(3):224-236.
- (18) Anton L, Brosnihan KB. Systemic and uteroplacental renin--angiotensin system in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2008; 2(5):349-362.
- (19) Takeda-Matsubara Y, Iwai M, Cui TX, Shiuchi T, Liu HW, Okumura M, Ito M, Horiuchi M. Roles of angiotensin type 1 and 2 receptors in pregnancy-associated blood pressure change. *Am J Hypertens* 2004; 17(8):684-689.
- (20) Nomura S, Ito T, Yamamoto E, Sumigama S, Iwase A, Okada M, Shibata K, Ando H, Ino K, Kikkawa F, Mizutani S. Gene regulation and physiological function of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during pregnancy. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1751(1):19-25.
- (21) Hagemann A, Nielsen AH, Poulsen K. The uteroplacental renin-angiotensin system: A review. *Exp Clin Endocrinol* 1994; 102:252-261.
- (22) Longo LD. Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy: a hypothesis of endocrinologic control. *Am J Physiol* 1983; 245(5 Pt 1):R720-R729.
- (23) Krane NK, Hamrahan M. Pregnancy: kidney diseases and hypertension. *Am J Kidney Dis* 2007; 49(2):336-345.
- (24) Chapman AB, Abraham WT, Zamudio S, Coffin C, Merouani A, Young D, Johnson A, Osorio F, Goldberg C, Moore LG, Dahms T, Schrier RW. Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. *Kidney Int* 1998; 54(6):2056-2063.
- (25) Ganzevoort W, Rep A, Bonsel GJ, de Vries JI, Wolf H. Plasma volume and blood pressure regulation in hypertensive pregnancy. *J Hypertens* 2004; 22(7):1235-1242.
- (26) Bridges EJ, Womble S, Wallace M, McCartney J. Hemodynamic monitoring in high-risk obstetrics patients, I. Expected hemodynamic changes in pregnancy. *Crit Care Nurse* 2003; 23(4):53-62.

- (27) Robson SC, Hunter S, Boys RJ, Dunlop W. Serial study of factors influencing changes in cardiac output during human pregnancy. *Am J Physiol* 1989; 256(4 Pt 2):H1060-H1065.
- (28) Clapp JF, III, Capeless E. Cardiovascular function before, during, and after the first and subsequent pregnancies. *Am J Cardiol* 1997; 80(11):1469-1473.
- (29) Moutquin JM, Garner PR, Burrows RF, Rey E, Helewa ME, Lange IR, Rabkin SW. Report of the Canadian Hypertension Society Consensus Conference: 2. Nonpharmacologic management and prevention of hypertensive disorders in pregnancy. *CMAJ* 1997; 157(7):907-919.
- (30) Brown MA, Lindheimer MD, de SM, Van AA, Moutquin JM. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertens Pregnancy* 2001; 20(1):IX-XIV.
- (31) Silver HM, Seebeck M, Carlson R. Comparison of total blood volume in normal, preeclamptic, and nonproteinuric gestational hypertensive pregnancy by simultaneous measurement of red blood cell and plasma volumes. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179(1):87-93.
- (32) Roberts JM, Lain KY. Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta* 2002; 23(5):359-372.
- (33) Chesley LC. Vascular reactivity in normal and toxemic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 1966; 9(4):871-881.
- (34) Gant NF, Daley GL, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J Clin Invest* 1973; 52(11):2682-2689.
- (35) Sibai BM. Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol* 2004; 103(5 Pt 1):981-991.
- (36) Visser W, Wallenburg HC. Central hemodynamic observations in untreated preeclamptic patients. *Hypertension* 1991; 17(6 Pt 2):1072-1077.
- (37) Stillman IE, Karumanchi SA. The glomerular injury of preeclampsia. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(8):2281-2284.
- (38) Gerretsen G, Huisjes HJ, Elema JD. Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 1981; 88(9):876-881.
- (39) Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia

and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93(10):1049-1059.

- (40) Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu* 1972; 1:177-191.
- (41) Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187(5):1416-1423.
- (42) Isaacs EB, Gadian DG, Sabatini S, Chong WK, Quinn BT, Fischl BR, Lucas A. The effect of early human diet on caudate volumes and IQ. *Pediatr Res* 2008; 63(3):308-314.
- (43) Aucott SW, Donohue PK, Northington FJ. Increased morbidity in severe early intrauterine growth restriction. *J Perinatol* 2004; 24(7):435-440.
- (44) Ross MG, Beall MH. Adult sequelae of intrauterine growth restriction. *Semin Perinatol* 2008; 32(3):213-218.
- (45) Dekker G, Sibai B. Primary, secondary, and tertiary prevention of pre-eclampsia. *Lancet* 2001; 357(9251):209-215.
- (46) Einarsson JJ, Sangi-Haghpeykar H, Gardner MO. Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188(5):1241-1243.
- (47) Saftlas AF, Levine RJ, Klebanoff MA, Martz KL, Ewell MG, Morris CD, Sibai BM. Abortion, changed paternity, and risk of preeclampsia in nulliparous women. *Am J Epidemiol* 2003; 157(12):1108-1114.
- (48) Sibai BM, Hauth J, Caritis S, Lindheimer MD, MacPherson C, Klebanoff M, VanDorsten JP, Landon M, Miodovnik M, Paul R, Meis P, Thurnau G, Dombrowski M, Roberts J, McNellis D. Hypertensive disorders in twin versus singleton gestations. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182(4):938-942.
- (49) Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; 365(9461):785-799.
- (50) Eskenazi B, Fenster L, Sidney S. A multivariate analysis of risk factors for preeclampsia. *JAMA* 1991; 266(2):237-241.
- (51) Chesley LC. Hypertension in pregnancy: definitions, familial factor, and remote prognosis. *Kidney Int* 1980; 18(2):234-240.

- (52) Lachmeijer AM, Dekker GA, Pals G, Aarnoudse JG, ten Kate LP, Arnggrimsson R. Searching for preeclampsia genes: the current position. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 105(2):94-113.
- (53) Falcao S, Solomon C, Monat C, Berube J, Gutkowska J, Lavoie JL. Impact of diet and stress on the development of preeclampsia-like symptoms in p57kip2 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296(1):H119-H126.
- (54) Tewksbury DA, Dart RA. High molecular weight angiotensinogen levels in hypertensive pregnant women. *Hypertension* 1982; 4:729-734.
- (55) VanWijk MJ, Kublickiene K, Boer K, VanBavel E. Vascular function in preeclampsia. *Cardiovasc Res* 2000; 47(1):38-48.
- (56) Cross JC. The genetics of pre-eclampsia: a feto-placental or maternal problem? *Clin Genet* 2003; 64(2):96-103.
- (57) Goetz RM, Morano I, Calovini T, Studer R, Holtz J. Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205(1):905-910.
- (58) Arnggrimsson R, Hayward C, Nadaud S, Baldursdottir A, Walker JJ, Liston WA, Bjarnadottir RI, Brock DJ, Geirsson RT, Connor JM, Soubrier F. Evidence for a familial pregnancy-induced hypertension locus in the eNOS-gene region. *Am J Hum Genet* 1997; 61(2):354-362.
- (59) Tempfer CB, Dorman K, Deter RL, O'Brien WE, Gregg AR. An endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2001; 20(1):107-118.
- (60) Walker ID. Thrombophilia in pregnancy. *J Clin Pathol* 2000; 53(8):573-580.
- (61) Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Fait G, Lessing JB. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999; 340(1):9-13.
- (62) Glueck CJ, Phillips H, Cameron D, Wang P, Fontaine RN, Moore SK, Sieve-Smith L, Tracy T. The 4G/4G polymorphism of the hypofibrinolytic plasminogen activator inhibitor type 1 gene: an independent risk factor for serious pregnancy complications. *Metabolism* 2000; 49(7):845-852.
- (63) D'Aniello G, Florio P, Sabatini L, Severi FM, Fineschi D, Cito G, Guidoni CG, Petraglia F. The search for thrombophilic gene mutations in women with gestational hypertension does not help in predicting poor pregnancy outcome. *J Hypertens* 2003; 21(10):1915-1920.

- (64) Falcao S, Bisotto S, Gutkowska J, Lavoie JL. Hyperhomocysteinemia is not sufficient to cause preeclampsia in an animal model: the importance of folate intake. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200(2):198.e1-198.e5.
- (65) Loverro G, Greco P, Capuano F, Carone D, Cormio G, Selvaggi L. Lipoperoxidation and antioxidant enzymes activity in pregnancy complicated with hypertension. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 70(2):123-127.
- (66) Zusterzeel PL, Visser W, Peters WH, Merkus HW, Nelen WL, Steegers EA. Polymorphism in the glutathione S-transferase P1 gene and risk for preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 96(1):50-54.
- (67) Crews JK, Herrington JN, Granger JP, Khalil RA. Decreased endothelium-dependent vascular relaxation during reduction of uterine perfusion pressure in pregnant rat. *Hypertension* 2000; 35(1 Pt 2):367-372.
- (68) Chen G, Wilson R, Wang SH, Zheng HZ, Walker JJ, McKillop JH. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene polymorphism and expression in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol* 1996; 104(1):154-159.
- (69) Vinatier D, Monnier JC. Pre-eclampsia: physiology and immunological aspects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995; 61(2):85-97.
- (70) de LB, I, Battini L, Simonelli M, Clemente F, Brunori E, Mariotti ML, Genazzani AR. Increased HLA-DR homozygosity associated with pre-eclampsia. *Hum Reprod* 2000; 15(8):1807-1812.
- (71) Arngrimsson R, Sigurard tS, Frigge ML, Bjarnad ttir RI, Jonsson T, Stefansson H, Baldursdottir A, Einarsdottir AS, Palsson B, Snorraddottir S, Lachmeijer AM, Nicolae D, Kong A, Bragason BT, Gulcher JR, Geirsson RT, Stefansson K. A genome-wide scan reveals a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia on chromosome 2p13. *Hum Mol Genet* 1999; 8(9):1799-1805.
- (72) Moses EK, Lade JA, Guo G, Wilton AN, Grehan M, Freed K, Borg A, Terwilliger JD, North R, Cooper DW, Brennecke SP. A genome scan in families from Australia and New Zealand confirms the presence of a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia, on chromosome 2. *Am J Hum Genet* 2000; 67(6):1581-1585.
- (73) Laivuori H, Lahermo P, Ollikainen V, Widen E, Haiva-Mallinen L, Sundstrom H, Laitinen T, Kaaja R, Ylikorkala O, Kere J. Susceptibility loci for preeclampsia on chromosomes 2p25 and 9p13 in Finnish families. *Am J Hum Genet* 2003; 72(1):168-177.
- (74) Laasanen J, Hiltunen M, Romppanen EL, Punnonen K, Mannermaa A, Heinonen S. Microsatellite marker association at chromosome region 2p13 in Finnish patients with preeclampsia and obstetric cholestasis suggests a common risk locus. *Eur J Hum Genet* 2003; 11(3):232-236.

- (75) Roten LT, Johnson MP, Forsmo S, Fitzpatrick E, Dyer TD, Brennecke SP, Blangero J, Moses EK, Austgulen R. Association between the candidate susceptibility gene ACVR2A on chromosome 2q22 and pre-eclampsia in a large Norwegian population-based study (the HUNT study). *Eur J Hum Genet* 2009; 17(2):250-257.
- (76) Caniggia I, Lye SJ, Cross JC. Activin is a local regulator of human cytotrophoblast cell differentiation. *Endocrinology* 1997; 138(9):3976-3986.
- (77) Jones RL, Findlay JK, Salamonsen LA. The role of activins during decidualisation of human endometrium. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006; 46(3):245-249.
- (78) Khalil A, Jauniaux E, Harrington K, Muttukrishna S. Placental production and maternal serum and urine levels of inhibin A and activin A are modified by antihypertensive therapy in hypertensive disorders of pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009; 70(6):924-931.
- (79) Bersinger NA, Smarason AK, Muttukrishna S, Groome NP, Redman CW. Women with preeclampsia have increased serum levels of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A), inhibin A, activin A and soluble E-selectin. *Hypertens Pregnancy* 2003; 22(1):45-55.
- (80) Petraglia F, Sawchenko P, Lim AT, Rivier J, Vale W. Localization, secretion, and action of inhibin in human placenta. *Science* 1987; 237(4811):187-189.
- (81) Smith C, Yndestad A, Halvorsen B, Ueland T, Waehre T, Otterdal K, Scholz H, Endresen K, Gullestad L, Froland SS, Damas JK, Aukrust P. Potential anti-inflammatory role of activin A in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(2):369-375.
- (82) Duley L, Meher S, Abalos E. Management of pre-eclampsia. *BMJ* 2006; 332(7539):463-468.
- (83) Knackstedt MK, Hamelmann E, Arck PC. Mothers in stress: consequences for the offspring. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54(2):63-69.
- (84) Coussons-Read ME, Okun ML, Nettles CD. Psychosocial stress increases inflammatory markers and alters cytokine production across pregnancy. *Brain Behav Immun* 2007; 21(3):343-350.
- (85) Munno I, Chiechi LM, Lacedra G, Berardesca C, Patimo C, Marcuccio L, Nardelli P, Loizzi P. Evaluation of nonspecific immunity and plasma levels of interferon-gamma, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in preeclampsia. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1999; 21(3):551-564.

- (86) CHUN D, BRAGA C, CHOW C, LOK L. Clinical observations on some aspects of hydatidiform moles. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1964; 71:180-184.
- (87) Wen SW, Demissie K, Yang Q, Walker MC. Maternal morbidity and obstetric complications in triplet pregnancies and quadruplet and higher-order multiple pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191(1):254-258.
- (88) Karumanchi SA, Bdolah Y. Hypoxia and sFlt-1 in preeclampsia: the "chicken-and-egg" question. *Endocrinology* 2004; 145(11):4835-4837.
- (89) Khong TY. Placental vascular development and neonatal outcome. *Semin Neonatol* 2004; 9(4):255-263.
- (90) Naicker T, Khedun SM, Moodley J, Pijnenborg R. Quantitative analysis of trophoblast invasion in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82(8):722-729.
- (91) Khong TY. Acute atherosclerosis in pregnancies complicated by hypertension, small-for-gestational-age infants, and diabetes mellitus. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115(7):722-725.
- (92) Sagol S, Ozkinay E, Oztekin K, Ozdemir N. The comparison of uterine artery Doppler velocimetry with the histopathology of the placental bed. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1999; 39(3):324-329.
- (93) Hague WM, Dekker GA. Risk factors for thrombosis in pregnancy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003; 16(2):197-210.
- (94) Roberts DJ, Post MD. The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *J Clin Pathol* 2008; 61(12):1254-1260.
- (95) Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 1997; 99(9):2152-2164.
- (96) Walsh SW, Parisi VM. The role of arachidonic acid metabolites in preeclampsia. *Semin Perinatol* 1986; 10(4):334-355.
- (97) Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; 111(5):649-658.
- (98) Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi

- SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 350(7):672-683.
- (99) Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA. Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med* 2008; 59:61-78.
 - (100) Solomon CG, Seely EW. Preeclampsia -- searching for the cause. *N Engl J Med* 2004; 350(7):641-642.
 - (101) Lockwood CJ, Krikun G, Caze R, Rahman M, Buchwalder LF, Schatz F. Decidual cell-expressed tissue factor in human pregnancy and its involvement in hemostasis and preeclampsia-related angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127:67-72.
 - (102) Zhou CC, Ahmad S, Mi T, Xia L, Abbasi S, Hewett PW, Sun C, Ahmed A, Kellems RE, Xia Y. Angiotensin II induces soluble fms-Like tyrosine kinase-1 release via calcineurin signaling pathway in pregnancy. *Circ Res* 2007; 100(1):88-95.
 - (103) Xia Y, Ramin SM, Kellems RE. Potential roles of angiotensin receptor-activating autoantibody in the pathophysiology of preeclampsia. *Hypertension* 2007; 50(2):269-275.
 - (104) Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291(3):H985-1002.
 - (105) Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA. Pathogenesis of preeclampsia. *Annu Rev Pathol* 2010; 5:173-192.
 - (106) Poston L, McCarthy AL, Ritter JM. Control of vascular resistance in the maternal and feto-placental arterial beds. *Pharmacol Ther* 1995; 65(2):215-239.
 - (107) Ashworth JR, Warren AY, Baker PN, Johnson IR. Loss of endothelium-dependent relaxation in myometrial resistance arteries in pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104(10):1152-1158.
 - (108) Pascoal IF, Lindheimer MD, Nalbantian-Brandt C, Umans JG. Preeclampsia selectively impairs endothelium-dependent relaxation and leads to oscillatory activity in small omental arteries. *J Clin Invest* 1998; 101(2):464-470.
 - (109) McCarthy AL. Abnormal endothelial cell function of resistance arteries from women with preeclampsia. 1993.
 - (110) McCarthy AL, Woolfson RG, Raju SK, Poston L. Abnormal endothelial cell function of resistance arteries from women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168(4):1323-1330.

- (111) Knock GA, Poston L. Bradykinin-mediated relaxation of isolated maternal resistance arteries in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175(6):1668-1674.
- (112) Yap SH, Moshage HJ, Hazenberg BP, Roelofs HM, Bijzet J, Limburg PC, Aarden LA, van Rijswijk MH. Tumor necrosis factor (TNF) inhibits interleukin (IL)-1 and/or IL-6 stimulated synthesis of C-reactive protein (CRP) and serum amyloid A (SAA) in primary cultures of human hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1091:405-408.
- (113) Belfort MA, Saade GR, Suresh M, Kramer W, Vedernikov YP. Effects of selected vasoconstrictor agonists on isolated omental artery from premenopausal nonpregnant women and from normal and preeclamptic pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174(2):687-693.
- (114) Hayman R, Brockelsby J, Kenny L, Baker P. Preeclampsia: the endothelium, circulating factor(s) and vascular endothelial growth factor. *J Soc Gynecol Investig* 1999; 6(1):3-10.
- (115) Kupfermanc MJ, Daniel Y, Englender T, Baram A, Many A, Jaffa AJ, Gull I, Lessing JB. Vascular endothelial growth factor is increased in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38(4):302-306.
- (116) Baker PN, Krasnow J, Roberts JM, Yeo KT. Elevated serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1995; 86(5):815-821.
- (117) Reuvekamp A, Velsing-Aarts FV, Poulina IE, Capello JJ, Duits AJ. Selective deficit of angiogenic growth factors characterises pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1999; 106(10):1019-1022.
- (118) Lyall F, Greer IA, Boswell F, Fleming R. Suppression of serum vascular endothelial growth factor immunoreactivity in normal pregnancy and in pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104(2):223-228.
- (119) Anthony FW, Evans PW, Wheeler T, Wood PJ. Variation in detection of VEGF in maternal serum by immunoassay and the possible influence of binding proteins. *Ann Clin Biochem* 1997; 34 (Pt 3):276-280.
- (120) Merrill DC, Karoly M, Chen K, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrine* 2002; 18(3):239-245.
- (121) AbdAlla S, Lothar H, el MA, Quitterer U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med* 2001; 7(9):1003-1009.

- (122) Wallis MG, Lankford MF, Keller SR. Vasopressin is a physiological substrate for the insulin-regulated aminopeptidase IRAP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293(4):E1092-E1102.
- (123) Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest* 1999; 103(7):945-952.
- (124) Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3:28.
- (125) Poranen AK, Ekblad U, Uotila P, Ahotupa M. Lipid peroxidation and antioxidants in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Placenta* 1996; 17(7):401-405.
- (126) Walsh SW, Wang Y. Deficient glutathione peroxidase activity in preeclampsia is associated with increased placental production of thromboxane and lipid peroxides. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169(6):1456-1461.
- (127) Hubel CA. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222(3):222-235.
- (128) Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008; 5(6):338-349.
- (129) Lorentzen B, Drevon CA, Endresen MJ, Henriksen T. Fatty acid pattern of esterified and free fatty acids in sera of women with normal and pre-eclamptic pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102(7):530-537.
- (130) Wickens D, Wilkins MH, Lunec J, Ball G, Dormandy TL. Free radical oxidation (peroxidation) products in plasma in normal and abnormal pregnancy. *Ann Clin Biochem* 1981; 18(Pt 3):158-162.
- (131) Wang Y, Walsh SW, Kay HH. Placental lipid peroxides and thromboxane are increased and prostacyclin is decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167(4 Pt 1):946-949.
- (132) Walsh SW, Wang Y. Secretion of lipid peroxides by the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169(6):1462-1466.
- (133) Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, III, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci* 2009; 16(2):206-215.
- (134) Schiessl B. Inflammatory response in preeclampsia. *Mol Aspects Med* 2007; 28(2):210-219.

- (135) McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34(4):255-262.
- (136) Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 1975; 56(1):56-64.
- (137) Pluim BM, Zwinderman AH, van der Laarse A, van der Wall EE. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation* 2000; 101(3):336-344.
- (138) Eghbali M, Wang Y, Toro L, Stefani E. Heart hypertrophy during pregnancy: a better functioning heart? *Trends Cardiovasc Med* 2006; 16(8):285-291.
- (139) Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ, Izumo S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 1992; 267(15):10551-10560.
- (140) Takahashi N, Calderone A, Izzo NJ, Jr., Maki TM, Marsh JD, Colucci WS. Hypertrophic stimuli induce transforming growth factor-beta 1 expression in rat ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1994; 94(4):1470-1476.
- (141) Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 1993; 73(3):413-423.
- (142) Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(8):589-600.
- (143) Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y, Toro L, Stefani E. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res* 2005; 96(11):1208-1216.
- (144) Gutkowska J, Paquette A, Wang D, Lavoie JM, Jankowski M. Effect of exercise training on cardiac oxytocin and natriuretic peptide systems in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293(1):R267-R275.
- (145) Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di DM, de FA, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F. PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 2001; 20(21):6050-6059.
- (146) McMullen JR, Shioi T, Huang WY, Zhang L, Tarnavski O, Bisping E, Schinke M, Kong S, Sherwood MC, Brown J, Riggi L, Kang PM, Izumo S. The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the

phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *J Biol Chem* 2004; 279(6):4782-4793.

- (147) Luo J, McMullen JR, Sobkiw CL, Zhang L, Dorfman AL, Sherwood MC, Logsdon MN, Horner JW, DePinho RA, Izumo S, Cantley LC. Class IA phosphoinositide 3-kinase regulates heart size and physiological cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biol* 2005; 25(21):9491-9502.
- (148) Crackower MA, Oudit GY, Kozieradzki I, Sarao R, Sun H, Sasaki T, Hirsch E, Suzuki A, Shioi T, Irie-Sasaki J, Sah R, Cheng HY, Rybin VO, Lembo G, Fratta L, Oliveira-dos-Santos AJ, Benovic JL, Kahn CR, Izumo S, Steinberg SF, Wymann MP, Backx PH, Penninger JM. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* 2002; 110(6):737-749.
- (149) Vanhaesebroeck B, Rohn JL, Waterfield MD. Gene targeting: attention to detail. *Cell* 2004; 118(3):274-276.
- (150) Sugden PH, Clerk A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med* 1998; 76(11):725-746.
- (151) Akhter SA, Luttrell LM, Rockman HA, Iaccarino G, Lefkowitz RJ, Koch WJ. Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science* 1998; 280(5363):574-577.
- (152) Wettschureck N, Rutten H, Zywiets A, Gehring D, Wilkie TM, Chen J, Chien KR, Offermanns S. Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of G α q/G α 11 in cardiomyocytes. *Nat Med* 2001; 7(11):1236-1240.
- (153) Mende U, Kagen A, Cohen A, Aramburu J, Schoen FJ, Neer EJ. Transient cardiac expression of constitutively active G α q leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(23):13893-13898.
- (154) Molkenstein JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998; 93(2):215-228.
- (155) Rothermel BA, McKinsey TA, Vega RB, Nicol RL, Mammen P, Yang J, Antos CL, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN, Williams RS. Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(6):3328-3333.
- (156) McKinsey TA, Olson EN. Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes. *J Clin Invest* 2005; 115(3):538-546.

- (157) Lim HW, De Windt LJ, Steinberg L, Taigen T, Witt SA, Kimball TR, Molkentin JD. Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 2000; 101(20):2431-2437.
- (158) Vega RB, Rothermel BA, Weinheimer CJ, Kovacs A, Naseem RH, Bassel-Duby R, Williams RS, Olson EN. Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(2):669-674.
- (159) Passier R, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, Overbeek P, Richardson JA, Grant SR, Olson EN. CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin Invest* 2000; 105(10):1395-1406.
- (160) Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Jr., Bers DM, Brown JH. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 2003; 92(8):912-919.
- (161) Euler-Taimor G, Heger J. The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2006; 69(1):15-25.
- (162) Lee CR, Watkins ML, Patterson JH, Gattis W, O'connor CM, Gheorghiade M, Adams KF, Jr. Vasopressin: a new target for the treatment of heart failure. *Am Heart J* 2003; 146(1):9-18.
- (163) Simmons LA, Gillin AG, Jeremy RW. Structural and functional changes in left ventricle during normotensive and preeclamptic pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283(4):H1627-H1633.
- (164) Lang RM, Pridjian G, Feldman T, Neumann A, Lindheimer M, Borow KM. Left ventricular mechanics in preeclampsia. *Am Heart J* 1991; 121(6 Pt 1):1768-1775.
- (165) Mabie WC, Ratts TE, Sibai BM. The central hemodynamics of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161(6 Pt 1):1443-1448.
- (166) Phelan JP, Yurth DA. Severe preeclampsia. I. Peripartum hemodynamic observations. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 144(1):17-22.
- (167) Hibbard JU, Shroff SG, Lang RM. Cardiovascular changes in preeclampsia. *Semin Nephrol* 2004; 24(6):580-587.
- (168) Peterson JA. Get moving! Physical activity counseling in primary care. *J Am Acad Nurse Pract* 2007; 19(7):349-357.
- (169) Leung FP, Yung LM, Laher I, Yao X, Chen ZY, Huang Y. Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (Part 1). *Sports Med* 2008; 38(12):1009-1024.

- (170) Bacon SL, Sherwood A, Hinderliter A, Blumenthal JA. Effects of exercise, diet and weight loss on high blood pressure. *Sports Med* 2004; 34(5):307-316.
- (171) Wasserman SM, Mehraban F, Komuves LG, Yang RB, Tomlinson JE, Zhang Y, Spriggs F, Topper JN. Gene expression profile of human endothelial cells exposed to sustained fluid shear stress. *Physiol Genomics* 2002; 12(1):13-23.
- (172) Kingwell BA. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. *FASEB J* 2000; 14(12):1685-1696.
- (173) Karolkiewicz J, Szczesniak L, Deskur-Smielecka E, Nowak A, Stemplewski R, Szeklicki R. Oxidative stress and antioxidant defense system in healthy, elderly men: relationship to physical activity. *Aging Male* 2003; 6(2):100-105.
- (174) Inoue N, Ramasamy S, Fukai T, Nerem RM, Harrison DG. Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ Res* 1996; 79(1):32-37.
- (175) Hollander J, Fiebig R, Gore M, Bejma J, Ookawara T, Ohno H, Ji LL. Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training. *Am J Physiol* 1999; 277(3 Pt 2):R856-R862.
- (176) Reddy Avula CP, Fernandes G. Modulation of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in salivary gland and other tissues in mice by moderate treadmill exercise. *Aging (Milano)* 1999; 11(4):246-252.
- (177) Melling CW, Thorp DB, Milne KJ, Krause MP, Noble EG. Exercise-mediated regulation of Hsp70 expression following aerobic exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293(6):H3692-H3698.
- (178) Locke M, Tanguay RM, Klabunde RE, Ianuzzo CD. Enhanced postischemic myocardial recovery following exercise induction of HSP 72. *Am J Physiol* 1995; 269(1 Pt 2):H320-H325.
- (179) Murlasits Z, Cutlip RG, Geronilla KB, Rao KM, Wonderlin WF, Alway SE. Resistance training increases heat shock protein levels in skeletal muscle of young and old rats. *Exp Gerontol* 2006; 41(4):398-406.
- (180) Puntchart A, Vogt M, Widmer HR, Hoppeler H, Billeter R. Hsp70 expression in human skeletal muscle after exercise. *Acta Physiol Scand* 1996; 157(4):411-417.
- (181) Fehrenbach E, Passek F, Niess AM, Pohla H, Weinstock C, Dickhuth HH, Northoff H. HSP expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32(3):592-600.

- (182) Paroo Z, Haist JV, Karmazyn M, Noble EG. Exercise improves postischemic cardiac function in males but not females: consequences of a novel sex-specific heat shock protein 70 response. *Circ Res* 2002; 90(8):911-917.
- (183) Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2000; 2(8):476-483.
- (184) Roberts JM, Gammill HS. Preeclampsia: recent insights. *Hypertension* 2005; 46(6):1243-1249.
- (185) Kasapis C, Thompson PD. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45(10):1563-1569.
- (186) Hamer M. The relative influences of fitness and fatness on inflammatory factors. *Prev Med* 2007; 44(1):3-11.
- (187) Flynn MG, McFarlin BK. Toll-like receptor 4: link to the anti-inflammatory effects of exercise? *Exerc Sport Sci Rev* 2006; 34(4):176-181.
- (188) Brown DA, Moore RL. Perspectives in innate and acquired cardioprotection: cardioprotection acquired through exercise. *J Appl Physiol* 2007; 103(5):1894-1899.
- (189) Brown DA, Chicco AJ, Jew KN, Johnson MS, Lynch JM, Watson PA, Moore RL. Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *J Physiol* 2005; 569(Pt 3):913-924.
- (190) Ranki HJ, Budas GR, Crawford RM, Davies AM, Jovanovic A. 17Beta-estradiol regulates expression of K(ATP) channels in heart-derived H9c2 cells. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40(2):367-374.
- (191) Zingman LV, Hodgson DM, Bast PH, Kane GC, Perez-Terzic C, Gumina RJ, Pucar D, Bienengraeber M, Dzeja PP, Miki T, Seino S, Alekseev AE, Terzic A. Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(20):13278-13283.
- (192) Exercise during pregnancy and the postpartum period. *Clin Obstet Gynecol* 2003; 46(2):496-499.
- (193) Olson D, Sikka RS, Hayman J, Novak M, Stavig C. Exercise in pregnancy. *Curr Sports Med Rep* 2009; 8(3):147-153.
- (194) Clapp JF. Influence of endurance exercise and diet on human placental development and fetal growth. *Placenta* 2006; 27(6-7):527-534.

- (195) Clapp JF, III. The effects of maternal exercise on fetal oxygenation and fetoplacental growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 110 Suppl 1:S80-S85.
- (196) Jackson MR, Gott P, Lye SJ, Ritchie JW, Clapp JF, III. The effects of maternal aerobic exercise on human placental development: placental volumetric composition and surface areas. *Placenta* 1995; 16(2):179-191.
- (197) Clapp JF, III, Kim H, Burciu B, Lopez B. Beginning regular exercise in early pregnancy: effect on fetoplacental growth. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(6):1484-1488.
- (198) Clapp JF, III, Kim H, Burciu B, Schmidt S, Petry K, Lopez B. Continuing regular exercise during pregnancy: effect of exercise volume on fetoplacental growth. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186(1):142-147.
- (199) Bergmann A, Zygmunt M, Clapp JF, III. Running throughout pregnancy: effect on placental villous vascular volume and cell proliferation. *Placenta* 2004; 25(8-9):694-698.
- (200) Collings CA, Curet LB, Mullin JP. Maternal and fetal responses to a maternal aerobic exercise program. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 145(6):702-707.
- (201) Clapp JF, III. *Exercising through your pregnancy*. Omaha: Addicus Books ed. 2001.
- (202) Weissgerber TL, Wolfe LA, Davies GA, Mottola MF. Exercise in the prevention and treatment of maternal-fetal disease: a review of the literature. *Appl Physiol Nutr Metab* 2006; 31(6):661-674.
- (203) Marcoux S, Brisson J, Fabia J. The effect of leisure time physical activity on the risk of pre-eclampsia and gestational hypertension. *J Epidemiol Community Health* 1989; 43(2):147-152.
- (204) Irwin DE, Savitz DA, St Andre KA, Hertz-Picciotto I. Study of occupational risk factors for pregnancy-induced hypertension among active duty enlisted Navy personnel. *Am J Ind Med* 1994; 25(3):349-359.
- (205) Sorensen TK, Williams MA, Lee IM, Dashow EE, Thompson ML, Luthy DA. Recreational physical activity during pregnancy and risk of preeclampsia. *Hypertension* 2003; 41(6):1273-1280.
- (206) Saftlas AF, Logsdon-Sackett N, Wang W, Woolson R, Bracken MB. Work, leisure-time physical activity, and risk of preeclampsia and gestational hypertension. *Am J Epidemiol* 2004; 160(8):758-765.

- (207) Meher S, Duley L. Exercise or other physical activity for preventing pre-eclampsia and its complications. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(2):CD005942.
- (208) Avery MD, Leon AS, Kopher RA. Effects of a partially home-based exercise program for women with gestational diabetes. *Obstet Gynecol* 1997; 89(1):10-15.
- (209) Yeo S, Steele NM, Chang MC, Leclaire SM, Ronis DL, Hayashi R. Effect of exercise on blood pressure in pregnant women with a high risk of gestational hypertensive disorders. *J Reprod Med* 2000; 45(4):293-298.
- (210) Khalil RA, Granger JP. Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283(1):R29-R45.
- (211) Paquette A, Wang D, Gauthier MS, Prud'homme D, Jankowski M, Gutkowska J, Lavoie JM. Specific adaptations of estrogen receptor alpha and beta transcripts in liver and heart after endurance training in rats. *Mol Cell Biochem* 2007; 306(1-2):179-187.
- (212) Carter AM. Animal models of human placentation--a review. *Placenta* 2007; 28 Suppl A:S41-S47.
- (213) Wong AY, Kulandavelu S, Whiteley KJ, Qu D, Langille BL, Adamson SL. Maternal cardiovascular changes during pregnancy and postpartum in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282(3):H918-H925.
- (214) Davisson RL, Hoffmann DS, Butz GM, Aldape G, Schlager G, Merrill DC, Sethi S, Weiss RM, Bates JN. Discovery of a spontaneous genetic mouse model of preeclampsia. *Hypertension* 2002; 39(2 Pt 2):337-342.
- (215) Dokras A, Hoffmann DS, Eastvold JS, Kienzle MF, Gruman LM, Kirby PA, Weiss RM, Davisson RL. Severe fetoplacental abnormalities precede the onset of hypertension and proteinuria in a mouse model of preeclampsia. *Biol Reprod* 2006; 75(6):899-907.
- (216) Hoffmann DS, Weydert CJ, Lazartigues E, Kutschke WJ, Kienzle MF, Leach JE, Sharma JA, Sharma RV, Davisson RL. Chronic tempol prevents hypertension, proteinuria, and poor fetoplacental outcomes in BPH/5 mouse model of preeclampsia. *Hypertension* 2008; 51(4):1058-1065.
- (217) Takimoto E, Ishida J, Sugiyama F, Horiguchi H, Murakami K, Fukamizu A. Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science* 1996; 274(5289):995-998.
- (218) Saito T, Ishida J, Takimoto-Ohnishi E, Takamine S, Shimizu T, Sugaya T, Kato H, Matsuoka T, Nangaku M, Kon Y, Sugiyama F, Yagami K, Fukamizu

- A. An essential role for angiotensin II type 1a receptor in pregnancy-associated hypertension with intrauterine growth retardation. *FASEB J* 2004; 18(2):388-390.
- (219) Furuya M, Ishida J, Inaba S, Kasuya Y, Kimura S, Nemori R, Fukamizu A. Impaired placental neovascularization in mice with pregnancy-associated hypertension. *Lab Invest* 2008; 88(4):416-429.
 - (220) Takimoto-Ohnishi E, Saito T, Ishida J, Ohnishi J, Sugiyama F, Yagami K, Fukamizu A. Differential roles of renin and angiotensinogen in the fetomaternal interface in the development of complications of pregnancy. *Mol Endocrinol* 2005; 19(5):1361-1372.
 - (221) Sakairi A, Ishida J, Honjo K, Inaba S, Nakamura S, Sugiyama F, Yagami K, Fukamizu A. Angiotensin type 1 receptor blockade prevents cardiac remodeling in mice with pregnancy-associated hypertension. *Hypertens Res* 2008; 31(12):2165-2175.
 - (222) Sata F, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Yamada T, Minakami H, Kishi R. Functional maternal catechol-O-methyltransferase polymorphism and fetal growth restriction. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16(11):775-781.
 - (223) Berg D, Sonsalla R, Kuss E. Concentrations of 2-methoxyoestrogens in human serum measured by a heterologous immunoassay with an ¹²⁵I-labelled ligand. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983; 103(2):282-288.
 - (224) Kanasaki K, Palmsten K, Sugimoto H, Ahmad S, Hamano Y, Xie L, Parry S, Augustin HG, Gattone VH, Folkman J, Strauss JF, Kalluri R. Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature* 2008; 453(7198):1117-1121.
 - (225) Kanayama N, Takahashi K, Matsuura T, Sugimura M, Kobayashi T, Moniwa N, Tomita M, Nakayama K. Deficiency in p57Kip2 expression induces preeclampsia-like symptoms in mice. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(12):1129-1135.
 - (226) Knox KS, Baker JC. Genome-wide expression profiling of placentas in the p57Kip2 model of pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2007; 13(4):251-263.
 - (227) Matsuura T, Takahashi K, Nakayama K, Kobayashi T, Choi-Miura NH, Tomita M, Kanayama N. Increased expression of vascular endothelial growth factor in placentas of p57(Kip2) null embryos. *FEBS Lett* 2002; 532(3):283-288.
 - (228) Takahashi K, Kobayashi T, Kanayama N. p57(Kip2) regulates the proper development of labyrinthine and spongiotrophoblasts. *Mol Hum Reprod* 2000; 6(11):1019-1025.

- (229) Podjarny E, Losonczy G, Baylis C. Animal models of preeclampsia. *Semin Nephrol* 2004; 24(6):596-606.
- (230) Granger JP, Alexander BT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens* 2001; 14(6 Pt 2):178S-185S.
- (231) Abitbol MM. Simplified technique to produce toxemia in the rat: considerations on cause of toxemia. *Clin Exp Hypertens B* 1982; 1(1):93-103.
- (232) Alexander BT, Rinewalt AN, Cockrell KL, Massey MB, Bennett WA, Granger JP. Endothelin type a receptor blockade attenuates the hypertension in response to chronic reductions in uterine perfusion pressure. *Hypertension* 2001; 37(2 Part 2):485-489.
- (233) St-Louis J, Massicotte G. Chronic decrease of blood pressure by rat relaxin in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 1985; 37(14):1351-1357.
- (234) Sigmund CD, Jones CA, Kane CM, Wu C, Lang JA, Gross KW. Regulated tissue- and cell-specific expression of the human renin gene in transgenic mice. *Circ Res* 1992; 70:1070-1079.
- (235) Yang G, Merrill DC, Thompson MW, Robillard JE, Sigmund CD. Functional expression of the human angiotensinogen gene in transgenic mice. *J Biol Chem* 1994; 269(51):32497-32502.
- (236) Fukamizu A, Seo MS, Hatae T, Yokoyama M, Nomura T, Katsuki M, Murakami K. Tissue-specific expression of the human renin gene in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; 165:826-832.
- (237) Lavoie JL, Lake-Bruse KD, Sigmund CD. Increased blood pressure in transgenic mice expressing both human renin and angiotensinogen in the renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(5):F965-F971.
- (238) Hoppe CC, Moritz KM, Fitzgerald SM, Bertram JF, Evans RG. Transient hypertension and sustained tachycardia in mice housed individually in metabolism cages. *Physiol Res* 2008.
- (239) Takase H, Moreau P, Kung CF, Nava E, Luscher TF. Antihypertensive therapy prevents endothelial dysfunction in chronic nitric oxide deficiency. Effect of verapamil and trandolapril. *Hypertension* 1996; 27(1):25-31.
- (240) Pollock DM, Rekito A. Hypertensive response to chronic NO synthase inhibition is different in Sprague-Dawley rats from two suppliers. *Am J Physiol* 1998; 275(5 Pt 2):R1719-R1723.

- (241) Garland EM, Sakata T, Fisher MJ, Masui T, Cohen SM. Influences of diet and strain on the proliferative effect on the rat urinary bladder induced by sodium saccharin. *Cancer Res* 1989; 49(14):3789-3794.
- (242) Kurtz TW, Griffin KA, Bidani AK, Davisson RL, Hall JE. Recommendations for blood pressure measurement in animals: summary of an AHA scientific statement from the Council on High Blood Pressure Research, Professional and Public Education Subcommittee. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(3):478-479.
- (243) Podymow T, August P. Hypertension in pregnancy. *Adv Chronic Kidney Dis* 2007; 14(2):178-190.
- (244) Mutze S, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Rath W. Genes and the preeclampsia syndrome. *J Perinat Med* 2008; 36(1):38-58.
- (245) Izzedine H, Massard C, Spano JP, Goldwasser F, Khayat D, Soria JC. VEGF signalling inhibition-induced proteinuria: Mechanisms, significance and management. *Eur J Cancer* 2009.
- (246) Nisell H, Hjendahl P, Linde B. Cardiovascular responses to circulating catecholamines in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *Clin Physiol* 1985; 5(5):479-493.
- (247) Yang Q, Hanesworth JM, Harding JW, Slinker BK. The AT4 receptor agonist [Nle1]-angiotensin IV reduces mechanically induced immediate-early gene expression in the isolated rabbit heart. *Regul Pept* 1997; 71(3):175-183.
- (248) Slinker BK, Wu Y, Brennan AJ, Campbell KB, Harding JW. Angiotensin IV has mixed effects on left ventricle systolic function and speeds relaxation. *Cardiovasc Res* 1999; 42(3):660-669.
- (249) Baker KM, Aceto JF. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *American Journal of Physiology* 1990; 259(2 Pt 2):H610-8.
- (250) Thomas WG, Mendelsohn FA. Angiotensin receptors: form and function and distribution. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35(6):774-779.
- (251) Yamahara N, Nomura S, Suzuki T, Itakura A, Ito M, Okamoto T, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S. Placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in maternal serum and placenta during normal pregnancy. *Life Sci* 2000; 66(15):1401-1410.
- (252) Mizutani S, Akiyama H, Kurauchi O, Taira H, Narita O, Tomoda Y. Plasma angiotensin I and serum placental leucine aminopeptidase (P-LAP) in pre-eclampsia. *Arch Gynecol* 1985; 236(3):165-172.

- (253) Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest* 2000; 105(11):1631-1639.
- (254) Maione A, Annemans L, Strippoli G. Proteinuria and clinical outcomes in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2009; 22(11):1137-1147.
- (255) Kemi OJ, Wisloff U. High-intensity aerobic exercise training improves the heart in health and disease. *J Cardiopulm Rehabil Prev* 2010; 30(1):2-11.
- (256) Russell JC, Epling WF, Pierce D, Amy RM, Boer DP. Induction of voluntary prolonged running by rats. *J Appl Physiol* 1987; 63(6):2549-2553.
- (257) Dohm MR, Richardson CS, Garland T, Jr. Exercise physiology of wild and random-bred laboratory house mice and their reciprocal hybrids. *Am J Physiol* 1994; 267(4 Pt 2):R1098-R1108.
- (258) Lambert MI, Noakes TD. Spontaneous running increases VO₂max and running performance in rats. *J Appl Physiol* 1990; 68(1):400-403.
- (259) MacNeil B, Hoffman-Goetz L. Chronic exercise enhances in vivo and in vitro cytotoxic mechanisms of natural immunity in mice. *J Appl Physiol* 1993; 74(1):388-395.
- (260) Meka N, Katragadda S, Cherian B, Arora RR. Endurance exercise and resistance training in cardiovascular disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2008; 2(2):115-121.